

Univerzita Karlova v Praze

2. lékařská fakulta

Studijní program: Biomedicína



Mgr. Klára Vilimovská Dědečková

Molekulární a epidemiologická charakteristika kmene
Burkholderia cenocepacia dominujícího u pacientů
s cystickou fibrózou v České republice

Molecular and epidemiological characteristics of *Burkholderia cenocepacia*
strain dominant in cystic fibrosis patients in the Czech Republic

Dizertační práce

Školitel: Doc. MUDr. Pavel Dřevínek, Ph.D.

Praha, 2013

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 30.9.2013

Klára Vilimovská Dědečková

Podpis

Identifikační záznam:

VILIMOVSKÁ DĚDEČKOVÁ Klára. Molekulární a epidemiologická charakteristika kmene *Burkholderia cenocepacia* dominujícího u pacientů s cystickou fibrózou v České republice [*Molecular and epidemiological characteristics of Burkholderia cenocepacia strain dominant in cystic fibrosis patients in the Czech Republic*] Praha, 2013, 120 stran, 3 přílohy, dizertační práce (Ph.D.), Univerzita Karlova v Praze, 2. lékařská fakulta, Ústav lékařské mikrobiologie, vedoucí práce Doc. MUDr. Pavel Dřevínek, Ph.D.

Klíčová slova:

cystická fibróza, bakterie komplexu *Burkholderia cepacia*, epidemický kmen, diagnóza, genotypizace, virulence

Keywords:

cystic fibrosis, *Burkholderia cepacia* complex, epidemic strain, diagnosis, genotyping, virulence

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat několika lidem:

- Doc. MUDr. Pavlovi Dřevínkovi, Ph.D. za stanovení tématu, vedení práce i studia, rady, pomoc, zprostředkování zahraniční stáže a zajištění finančních prostředků.
- Doc. MUDr. Ondřejovi Cinkovi, Ph.D. za využití pracovního prostoru a přístrojů v Laboratoři molekulární genetiky Pediatrické kliniky a Ústavu lékařské mikrobiologie, které jsem potřebovala ke své práci a za jeho rady.
- Všem klinickým pracovníkům z Centra cystické fibrózy v Praze, Hradci Králové, Plzni, Olomouci a Brně za jejich spolupráci.
- Paní Helence Reitzové za její milý přístup a pomoc při mých začátcích v laboratoři. Děkuji, Helenko!
- Dr. Annette Vergunst a Davidovi O'Callaghanovi za jejich milý, vstřícný a přátelský přístup během tří měsíců, které jsem strávila u nich v laboratoři.
- Mým kolegyním Petře Dušátkové, Lucce Kalferstové, Lence Kramné, Lence Dušátkové, Mileně Antuškové, Ivě Železné, Klárce Veselé, Jolaně Vávrové a Katce Holkové z Laboratoře molekulární genetiky, které nejsou pouze kolegyně, ale staly se mými kamarádkami.
Holky, všem vám moc děkuji za vaši podporu a přátelství!
- Velký dík patří hlavně Lucce Kalferstové a Petře Dušátkové za to, že si našly čas a opakovaně četly tuto práci.
- Děkuji svým rodičům a své sestře za jejich podporu během mého dosavadního studijního života. Děkuji Vám!
- Na závěr bych chtěla poděkovat svému manželovi Petrovi Vilimovskému, za jeho podporu, jeho ramena, o které se mohu kdykoliv opřít. Za to, že věří v mé schopnosti více než já sama a za to, že mě bere takovou jaká jsem!
Pěťo, moc Ti děkuji!

Obsah:

1.	CYSTICKÁ FIBRÓZA, BAKTERIE KOMPLEXU BURKHOLDERIA CEPACIA A TYPIZACE BAKTERIÍ	14
1.1.	Cystická fibróza	14
1.2.	Bakterie komplexu <i>Burkholderia cepacia</i>	15
1.2.1.	Stručná charakteristika	15
1.2.2.	Taxonomie komplexu	16
1.2.3.	Cesty přenosu a klinický průběh infekce Bcc u cystické fibrózy	16
1.2.4.	Prevalence a distribuce druhů Bcc v zahraničních centrech cystické fibrózy	18
1.2.5.	Epidemické kmeny Bcc	20
1.2.6.	Epidemiologická situace Bcc v CCF ve Fakultní nemocnici v Motole	21
1.2.7.	Mikrobiologická diagnostika Bcc ve Fakultní nemocnici v Motole	22
1.2.8.	Faktory virulence	23
1.3.	Typizace bakterií	26
1.3.1.	Fenotypizace	26
1.3.2.	Genotypizace	27
2.	UŽITEČNOST NESTED PCR DETEKUJÍCÍ BAKTERIE KOMPLEXU BURKHOLDERIA CEPACIA Z KLINICKÉHO MATERIÁLU	34
2.1.	Metodika	34
2.2.	Výsledky	34
2.3.	Diskuze	38
3.	SURVEILLANCE INFEKČÍ BAKTERIÍ KOMPLEXU BURKHOLDERIA CEPACIA VE FAKULTNÍ NEMOCNICI V MOTOLE	40
3.1.	Genotypizační metody u Bcc	40
3.1.1.	Metodika genotypizačních metod	41
3.1.2.	Výsledky – výběr vhodných genotypizačních metod	45
3.2.	Genomická subtraktivní hybridizace	50
3.2.1.	Princip GSH	50
3.2.2.	Metodika GSH	54
3.2.3.	Výsledky GSH	57
3.3.	Kmenově specifická PCR pro kmen <i>Burkholderia cenocepacia</i> ST32 (ST32-PCR) ..	67
3.3.1.	Metodika ST32-PCR	67
3.3.2.	Výsledky ST32-PCR	68
3.4.	Systém mikrobiologické surveillance Bcc infekcí ve FN v Motole	71
3.5.	Diskuze	73
4.	EPIDEMIOLOGIE INFEKČÍ BAKTERIÍ KOMPLEXU BURKHOLDERIA CEPACIA VE FAKULTNÍ NEMOCNICI V MOTOLE	75
4.1.	Studium epidemiologické situace	75
4.2.	Výsledky	76
4.3.	Diskuze	79
5.	STUDIUM VIRULENCE BURKHOLDERIA CENOCEPACIA ST32 POMOCÍ MODELOVÉHO ORGANISMU	80
5.1.	Modelový organismus – Danio pružované (<i>Danio rerio</i>)	81
5.2.	Metodika studia virulence na modelovém organismu	83
5.2.1.	Práce s modelovým organismem před zahájením experimentu	86
5.2.2.	Analýza přežití mikroorganismu v hostiteli	89
5.2.3.	Kinetická analýza	89
5.2.4.	Analýza průběhu infekce v reálném čase	89
5.3.	Výsledky studia virulence	91
5.3.1.	Analýza přežití mikroorganismu v hostiteli	91

5.3.2.	Kinetická analýza	92
5.3.3.	Analýza průběhu infekce v reálném čase	93
5.4.	Diskuze	96
6.	PLICNÍ MIKROBIOM U PACIENTŮ S CYSTICKOU FIBRÓZOU	97
6.1.	Metodika studia plicního mikrobiomu	97
6.2.	Výsledky	98
6.3.	Diskuze	102
7.	DALŠÍ SMĚRY VÝZKUMU	103
8.	ZÁVĚR.....	105
9.	LITERATURA	106
10.	SEZNAM TABULEK, OBRÁZKŮ, GRAFŮ A SCHÉMAT	114
11.	PUBLIKACE.....	117
11.1.	Publikace č. 1.....	117
11.2.	Publikace č. 2.....	118
11.3.	Publikace č. 3.....	119

Seznam zkratk:

AFLP	amplified fragment length polymorphism, genotypizační metoda založená na délkovém polymorfismu amplifikovaných fragmentů
BCESM	<i>Burkholderia cepacia</i> epidemic strain marker, marker transmisivity přenosných kmenů bakterií komplexu <i>Burkholderia cepacia</i>
BCSA	<i>Burkholderia cepacia</i> selective agar, selektivní agar ke stanovení bakterií komplexu <i>Burkholderia cepacia</i>
BOX-PCR	genotypizační metoda založená na amplifikaci oblastí ohraničených repetitivními elementy nazývaných BOX
CCF	centrum cystické fibrózy
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
CF	cystická fibróza
CFTR	cystic fibrosis transmembrane receptor, transmembránový regulátor vodivosti iontů
CS	cepacia syndrom
CZ1	původní označení českého epidemického kmene, později potvrzen jako <i>Burkholderia cenocepacia</i> ST32
ČR	Česká republika
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTPs	deoxynukleotid trifosfáty
ET12	elektroforetický typ 12, epidemická linie popsána na základě multilokusové enzymové elektroforézy
ERIC-PCR	genotypizační metoda založená na amplifikaci oblastí ohraničených repetitivními elementy ERIC
FN	fakultní nemocnice
GSH	genomická subtraktivní hybridizace
GTG-PCR	genotypizační metoda založena na amplifikaci oblastí mezi repetitivními elementy GTG
IBCWG	International <i>Burkholderia cepacia</i> working group, Mezinárodní pracovní skupina pro bakterie komplexu <i>Burkholderia cepacia</i>
ISR	intergenic ribosomal region, mezigenová oblast mezi geny pro velkou a malou ribozomální podjednotku
LMG	Laboratoř molekulární genetiky
MALDI-TOF	matrix assisted laser desorption ionisation-time of flight, hmotnostní spektrometr s ionizací laserem za přítomnosti matrice a detektorem doby letu
MLST	multilocus sequence typing, multilokusová sekvenční typizace
PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PCR	polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce

PFGE	pulsed field electrophoresis, elektroforéza v pulzním poli
PHDC	Philadelphia-DC, epidemický kmen rozšířený v centrech cystické fibrózy ve Filadelfii
RAPD	random amplified polymorphic DNA, náhodná amplifikace polymorfních úseků DNA
Rep-PCR	obecné označení pro genotypizační metody založené na amplifikaci oblastí ohraničených repetitivními elementy
REP-PCR	genotypizační metoda založená na amplifikaci oblastí ohraničených repetitivními elementy REP
RISA	ribosomal intergenic spacer analysis, analýza mezigenového prostoru mezi malou a velkou ribozomální podjednotkou
RNA	ribonukleová kyselina
rMLST	ribosomal multilocus sequence typing, ribozomální multilokusová sekvenční typizace
rRNA	ribozomální ribonukleová kyselina
ST	sekvenční typ
ST32-PCR	polymerázová řetězová reakce specificky detekující epidemický kmen <i>Burkholderia cenocepacia</i> ST32
tRNA	transferová ribonukleová kyselina
UK	United Kingdom, Spojené království
ÚLM	Ústav lékařské mikrobiologie
USA	United States of America, Spojené státy americké

Seznam publikací, které jsou součástí této dizertační práce:

1. Drevínek P, Vosahlikova S, Dedeckova K, Cinek O, Mahenthiralingam E: Direct culture-independent strain typing of *Burkholderia cepacia* complex in sputum samples from patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol. 2010 May;48(5):1888-91.
2. Dedeckova K, Fila L, Skalicka V, Bartosova J, Kucerova T, Vavrova V, Zemkova D, Kalferstova L, Melter O, Cinek O, Drevínek P: PCR detection of *Burkholderia cepacia* complex as one of key factors to handle a long-term outbreak. J Cyst Fibros. 2012 Sep;11(5):440-5.
3. Dedeckova K, Kalferstova L, Strnad H, Vavrova J, Drevínek P: Novel diagnostic PCR assay for *Burkholderia cenocepacia* epidemic strain ST32 and its utility in monitoring infection in cystic fibrosis patients. J Cyst Fibros. 2013 Sep; 12(5):475-81.

Problematika této dizertační práce se stala také předmětem následujících odborných sdělení a textů:

1. Dedeckova K, Fila L, Skalicka V, Bartosova J, Kucerova T, Vavrova V, Melter O, Cinek O, Drevínek P: Usefulness of PCR-based examination in early diagnostics and monitoring of infection with *Burkholderia cepacia* complex. **Přednáška na 14. setkání IBCWG, 2010, Seattle, Spojené státy americké.**
2. Dedeckova K, Fila L, Skalicka V, Bartosova J, Kucerova T, Vavrova V, Drevínek P: The fate of epidemic strain *Burkholderia cenocepacia* ST32 in the Prague CF centre. **Přednáška na 15. setkání IBCWG, 2011, Praha, ČR.**
3. Dedeckova K, Fila L, Skalicka V, Bartosova J, Kucerova T, Vavrova V, Drevínek P: The end of long-term outbreak with highly transmissible *Burkholderia cenocepacia* ST32 in the CF centre in Prague. **Přednáška na 34. evropské konferenci cystické fibrózy, 2011, Hamburk, Německo.**
4. Dedeckova K, Vergunst A, Drevínek P: Analysis of virulence of *Burkholderia cenocepacia* ST32 isolates from cystic fibrosis patients in zebra fish embryos. **Přednáška na 16. setkání IBCWG, 2012, Montreal, Kanada.**
5. Dědečkova K, Fila L, Skalická V, Bartošová J, Kučerová T, Vávrová V, Melter O, Cinek O, Dřevínek P: Konec dlouhotrvající epidemie v Centru cystické fibrózy v Praze Motole. **Přednáška na Vědecké konferenci 2. LF UK, 2012, Praha, Česká republika.**

6. Vilimovska Dedekova K, Vergunst A, Drevinek P: Real time analysis of *Burkholderia cenocepacia* ST32 isolates in a zebrafish embryo model. **Přednáška na 17. setkání IBCWG, 2013, Ann Arbor, Spojené státy americké.**
7. Dedekova K, Vergunst A, Drevinek P: A high degree of variation in virulence of clonal *Burkholderia cenocepacia* ST32 isolates from cystic fibrosis patients in zebra fish embryos. **Přednáška na 36. evropské konferenci cystické fibrózy, 2013, Lisabon, Portugalsko.**
8. Dedekova K, Cinek O, Melter O, Drevinek P: The role of PCR in early diagnostic and monitoring of infection with *Burkholderia cepacia* complex. J Cyst Fibros, 2010, IF 1,550 – **abstrakt přijatý v recenzovaném časopise.**
9. Dedekova K, Fila L, Skalicka V, Bartosova J, Vavrova V, Zemkova D, Kucerova T, Cinek O, Drevinek P: The end of a long-term outbreak with highly transmissible *Burkholderia cenocepacia* ST32. J Cyst Fibros, 2011, IF 2,239 - **abstrakt přijatý v recenzovaném časopise.**
10. Dedekova K, Kalferstova L., Vavrova J, Strnad H., Drevinek P: A novel diagnostic PCR identification of highly transmissible *Burkholderia cenocepacia* ST32 infection. J Cyst Fibros, 2012, IF 2, 840 - **abstrakt přijatý v recenzovaném časopise.**
11. Dedekova K, Vergunst A, Drevinek P: A high degree of variation in virulence of clonal *Burkholderia cenocepacia* ST32 isolates from cystic fibrosis patients in zebra fish embryos. J Cyst Fibros., 2013, S9, IF 3,190 – **abstrakt přijatý v recenzovaném časopise.**
12. Flight WG, Marchesi JR, Norville P, Dedekova K, Bull M, Bright-Thomas RJ, Mutton KJ, Drevinek P, Jones AM, Mahenthiralingam E: Ribosomal RNA intergenic spacer analysis (RISA) as a rapid and diagnostic means to profile microbial diversity in cystic fibrosis sputum. J Cyst Fibros., 2013, S80, IF 3,190 – **abstrakt přijatý v recenzovaném časopise.**

Souhrn:

Bakterie komplexu *Burkholderia cepacia* představují nejzávažnější plicní patogeny pro pacienty s cystickou fibrózou. Jejich závažnost je dána hlavně jejich rezistencí na antibiotika a schopností šířit se mezi pacienty. Řada center cystické fibrózy ve světě, stejně tak největší české Centrum cystické fibrózy ve Fakultní nemocnici v Motole čelila epidemickému rozsevu infekce. V 90. letech 20. století se v tomto centru rozšířil kmen *Burkholderia cenocepacia* ST32.

Mezi cíle předkládané práce jsme zahrnuli studium epidemiologické situace bakterií komplexu *Burkholderia cepacia* v populaci pacientů, které navštěvují Centrum cystické fibrózy (CCF) ve Fakultní nemocnici (FN) v Motole téměř 17 let od doby, kdy jsme v tomto CCF zaznamenali první případy pacientů s infekcí Bcc. Dalšími cíli bylo zhodnocení přínosu molekulárně genetické diagnostiky bakterií komplexu *Burkholderia cepacia* deset let od jejího zavedení v rutinní diagnostice, zlepšení systému surveillance nejen zavedením jednoduchého a specifického testu určeného k detekci českého epidemického kmene, ale také zavedením metod genotypizace, které umožňují stanovení kmenové příslušnosti v ostatních případech infekce. Posledním cílem byla charakteristika epidemického kmene z hlediska virulence.

V předkládané práci jsme:

- potvrdili nezastupitelnou roli molekulárně genetické diagnostiky v rutinním vyšetřovacím schématu bakterií komplexu *Burkholderia cepacia* spočívající v její citlivosti a časně detekci
- zjistili, že v populaci pacientů s cystickou fibrózou již nedochází k šíření epidemického kmene *Burkholderia cenocepacia* ST32
- provedením genomické subtraktivní hybridizace v genomu českého epidemického kmene našli vhodnou oblast pro navržení polymerázové řetězové reakce jako diagnostického testu
- stávající systém diagnostiky a surveillance rozšířili o specifický diagnostický test a vhodné metody genotypizace
- zjistili vysoký stupeň variability ve virulenci klinických izolátů *B. cenocepacia* ST32 pocházejících nejen z různých fází infekce, ale i od různých pacientů

Summary

Bacteria from *Burkholderia cepacia* complex represent the most serious pathogens for patients with cystic fibrosis. Their severity is caused by their antibiotic resistance and ability to spread among patients with cystic fibrosis. Many cystic fibrosis centres around the world, also the biggest Czech Cystic Fibrosis Centre in University Hospital in Motol, faced outbreak. In the 1990's the epidemic strain *Burkholderia cenocepacia* ST32 spread in a population of cystic fibrosis patients.

One of the goals of the current thesis was to study epidemiological situation of *Burkholderia cepacia* complex in the population of cystic fibrosis patients attending Cystic Fibrosis Centre in University Hospital Motol almost seventeen years after first cases of infected patients with Bcc infection. Other goals were: to evaluate a usefulness of molecular genetic diagnostics of *Burkholderia cepacia* complex ten years after its implementation in routine diagnostics, to improve surveillance system not only by implementation of simple and specific test for detection of epidemic strain, but also by implementation of genotyping methods that are able to determine strain in other cases of infection. The last goal was to characterize the epidemic strain from virulence point of view.

Based on the thesis we:

- confirmed usefulness of molecular genetic diagnostics of *Burkholderia cepacia* complex in a routine examination scheme
- found out that epidemic strain stop spreading in population of cystic fibrosis patients
- found out suitable region in genome of epidemic strain for designing of polymerase chain reaction as a diagnostics tool by using genomic subtractive hybridisation
- improved the current diagnostics and surveillance system by implementation of specific diagnostics test and suitable genotyping methods
- observed high degree of variation in virulence potential of *Burkholderia cenocepacia* ST32 clinical isolates collected not only from different phases of chronic infection, but also from different patients.

I. OBECNÁ ČÁST

1. CYSTICKÁ FIBRÓZA, BAKTERIE KOMPLEXU *BURKHOLDERIA CEPACIA* A TYPIZACE BAKTERIÍ

1.1. Cystická fibróza

Cystická fibróza (CF) představuje jedno z nejčastějších autozomálně recesivních onemocnění v kavkazské populaci. Příčinou tohoto onemocnění je mutace v obou alelách genu pro transmembránový regulátor vodivosti iontů (CFTR, cystic fibrosis transmembrane regulator) nacházející se na dlouhém raménku sedmého chromozomu. Hlavní funkcí CFTR proteinu, který se nachází v buňkách dýchacích cest, vývodech pankreatu, žlučovodech, v potních žlázách a v pohlavním ústrojí mužů, je transport iontů chloridu přes buněčnou membránu. CFTR protein zároveň reguluje funkci sodíkového kanálu (ENaC) a iontového chloridového kanálu (ORCC) (1). U pacientů s CF mutace v *CFTR* genu způsobují ztrátu transportu chloridových iontů skrz CFTR protein a dochází k akumulaci hustého hlenu v průduškách plic, ztrátě exokrinní funkce pankreatu s narušenou střevní absorpcí, reprodukční dysfunkcí a zvýšené koncentraci chloridů v potu (2). Nejzávažněji jsou mutací v *CFTR* genu postiženy dýchací cesty, kde odpovědí na nulovou či sníženou expresi CFTR proteinu je zvýšená produkce hlenu, který není z plic odstraněn a stává se ideálním prostředím pro množení mikroorganismů.

Včasná diagnóza představuje pro pacienty s CF šanci na delší a aktivně prožitý život. Z tohoto důvodu bylo 1. října 2009 do panelu testů novorozeneckého screeningu všech dětí narozených na území České republiky zařazeno vyšetření hladiny imunoreaktivního trypsinogenu z kapky krve (3). Incidence CF v České republice se odhadovala 1 : 2 700 nově narozených dětí. Poslední studie vycházející z výsledků novorozeneckého screeningu odhalila, že incidence je dvakrát nižší (1 : 4 023), při současné porodnosti lze očekávat, že se ročně narodí přibližně 30 dětí s CF (4). Přes vysoký standard v léčbě se pacienti s CF v České republice dožívají průměrného věku 32 let. Jedná se o věk, který je srovnatelný s věkem pacientů v jiných státech Evropy či Spojených státech amerických (USA).

Příčinou zvýšené morbidity a mortality pacientů s CF jsou opakované, chronické infekce dýchacích cest vedoucí k poškození plicního parenchymu, které dále progreduje a dochází k respiračnímu selhání a smrti pacienta. U CF existuje určité spektrum mikroorganismů, tzv. plicní mikrobiom, tyto mikroorganismy se mohou podílet se na rozvoji infekcí plic. Donedávna se jako plicní mikrobiom u CF považovalo úzké spektrum mikroorganismů

zahrnující aerobní či obligátně aerobní bakterie jako jsou *Pseudomonas aeruginosa* (PA), *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Stenotrophomonas maltophilia* a bakterie komplexu *Burkholderia cepacia*, dále plísňe a viry (5). S rozvojem metod nezávislých na kultivaci došlo k zjištění, že se v plicích pacientů s CF ve značné míře vyskytuje i široké spektrum anaerobních bakterií (6, 7) jako například *Prevotella* spp., *Veillonella* spp., *Propionibacterium* spp., viridující streptokoky ze skupiny *Streptococcus milleri* a další. Infekce u CF mají tedy většinou polymikrobiální charakter (8). Mezi ty nejzávažnější plicní patogeny řadíme bakterie komplexu *Burkholderia cepacia* (Bcc).

1.2. Bakterie komplexu *Burkholderia cepacia*

1.2.1. Stručná charakteristika

Bakterie komplexu *Burkholderia cepacia* (Bcc) jsou gramnegativní, aerobní a pohyblivé tyčinky. Přírodním rezervoárem těchto bakterií je příroda. Nejčastěji se vyskytují v půdě, stojaté či tekoucí vodě (9). V přírodě se mohou chovat jako symbionti kořenového systému rostlin, i jako rostlinný patogen způsobující hnilobu: první popsáný člen komplexu *B. cepacia* způsobil hnilobu cibule (10). Další role bakterií komplexu *Burkholderia cepacia* spočívá v ochraně významných zemědělských plodin proti houbovým infekcím produkcí antimikrobiálních sloučenin. Bakterie Bcc jsou schopny ve svém metabolismu využívat těžké kovy (chrom, rtuť, olovo), degradují některé polutanty (trichlorethylen), chlorované aromatické sloučeniny (polychlorované bifenyly), které mohou být součástí pesticidů či herbicidů (9). Tyto bakterie našly uplatnění v řadě průmyslových odvětví a zemědělství, nicméně jejich schopnost vyvolat závažné infekce u pacientů nejen s CF, ale také u pacientů s chronickou granulomatózou, pacientů onkologických, na anesteziologicko-resuscitačních jednotkách a jednotkách intenzivní péče, vyvolává diskuze mezi vědci, lékaři a zemědělci o jejich využívání.

Charakteristické pro Bcc je velikost a složení jejich genomu, které oproti jiným bakteriím jsou složeny ze 3 chromozomů a mohou mít i plazmid. Velikost genomu se pohybuje od 6 do 8 Mb, obsah GC bází je vysoký - více jak 60 % (11, 12). V genomu se nachází několik typů inserčních sekvencí a mnoho genomických ostrovů, které jsou zodpovědné za plasticitu genomu Bcc.

1.2.2. Taxonomie komplexu

V roce 1950 byl W. H. Burkholderem popsán první člen Bcc *Pseudomonas cepacia* jako rostlinný patogen způsobující hnilobu cibule (10). Uvnitř druhu *P. cepacia* byla značná fenotypická diverzita, která vedla k taxonomickým studiím. Na základě jedné z nich provedené v roce 1992 bylo několik druhů *Pseudomonas*, zahrnující i *P. cepacia*, překlasifikováno a zařazeno do nového rodu *Burkholderia* (13). O pět let později byla zavedena taxonomická jednotka genomvar, která odpovídá bakteriálnímu druhu definovanému na základě molekulárně genetických metod. V této době bylo pět nově zavedených genomvarů sjednoceno pod označení komplex bakterií *Burkholderia cepacia* sdružující úzce příbuzné druhy, které nelze rozlišit pomocí fenotypizačních metod (14). Dále se tento komplex rozšiřoval o další genomvary - druhy *B. stabilis*, *pyrrocinia*, *anthina*, *ambifaria* (15-17). Při klasifikaci kmenů druhu *B. cenocepacia* došlo k rozdělení druhu do čtyř fylogenetických podjednotek podle genu *recA* na IIIA, IIIB, IIIC a IIID (18). Od roku 2004 se na základě analýzy sekvencí genu *recA* komplex rozšířil o Skupinu K (Group K), BCC1 a BCC2 (19). Studie založené na multilokusové sekvenční typizaci (MLST) přerozdělily skupiny do nových druhů Bcc: Skupina K, BCC1, BCC2, BCC3, BCC4, BCC5 a BCC6 (20, 21). Typizační metodě MLST se tato práce věnuje v kapitole 1.3. Typizace bakterií. Postupně se opouští od užívání taxonomické jednotky genomvar. V současné době se komplex skládá ze 17 úzce příbuzných druhů, nicméně řada probíhajících studií sekvenování *recA* genu či využívající metodiky MLST naznačují, že pravděpodobně existuje stále řada druhů, které čekají na pojmenování a zařazení (22). Současná podoba komplexu je shrnuta v Tabulce č. 1.

1.2.3. Cesty přenosu a klinický průběh infekce Bcc u cystické fibrózy

Infekce Bcc jsou problematické pro skupinu pacientů s CF zejména z důvodu jejich přirozené a získané rezistence na antibiotika. Je tedy obtížné tyto bakterie eradikovat, navíc se setkáváme v rámci tohoto komplexu s výskytem kmenů, které se šíří v populacích pacientů s CF. Infekce Bcc bývají někdy kontraindikací k transplantaci plic, zejména v případě infekce epidemickým kmenem. Řada studií se shoduje v tom, že pacienti s infekcí Bcc po transplantaci přežívají kratší dobu než pacienti bez infekce Bcc (23, 24).

Mezi cesty přenosu infekce Bcc patří přímý kontakt s infikovaným pacientem či kapénkovou infekcí (25). Nepřímá cesta přenosu je zprostředkována rukama personálu, prostřednictvím kontaminovaných předmětů (hračky, inhalátory) (26, 27) nebo kontaminovanými aerosoly

určených k inhalaci (28), dezinfekčními přípravky a kosmetickými prostředky (29). Někdy cesty přenosu nejsou jednoznačné, zejména v případě šíření přenosných kmenů.

Tabulka č. 1. Současná taxonomická podoba Bcc s místem výskytu izolátů jednotlivých druhů. CF izolát od pacienta s CF; non-CF klinický izolát; Z zemina; R rostliny; V voda; K kontaminace. Převzato a upraveno (22).

Druhové jméno	Dříve	Místo výskytu
<i>B. cepacia</i>	Genomovar I	CF, non-CF; Z, R, říční V
<i>B. multivorans</i>	Genomovar II	CF, non-CF, Z, R, říční V, K
<i>B. cenocepacia</i>	Genomovar III	CF, non-CF, Z, R, říční V, K průmyslová
<i>B. stabilis</i>	Genomovar IV	CF, non-CF, K nemocniční, R
<i>B. vietnamiensis</i>	Genomovar V	CF, non-CF, Z, R, říční V, K průmyslová
<i>B. dolosa</i>	Genomovar VI	CF, R, Z
<i>B. ambifaria</i>	Genomovar VII	CF, Z
<i>B. anthina</i>	Genomovar VIII	CF, non-CF, Z, R, říční V, K nemocniční
<i>B. pyrrocinia</i>	Genomovar IX	CF, non-CF, Z, říční V
<i>B. ubonensis</i>	Genomovar X	Non-CF, Z
<i>B. lates</i>	BCC1	CF
<i>B. diffusa</i>	BCC2	CF, non-CF, Z
<i>B. arboris</i>	BCC3	CF, non-CF, Z, říční V, K průmyslový
<i>B. seminalis</i>	BCC7	CF, non-CF, Z, R
<i>B. metallica</i>	BCC8	CF
<i>B. contaminans</i>	Skupina K (BCC AT)	CF, non-CF, ovce, R, K
<i>B. lata</i>	Skupina K	CF, non-CF, Z, R, říční V, K průmyslový

Infekce způsobené Bcc mají většinou chronický charakter, nicméně se můžeme setkat i s přechodným kolonizováním pacienta s tzv. transientní infekcí. Transientní infekce byly popsány v několika center CF (30, 31), většinou jsou tyto infekce způsobeny nepřenositelnými kmeny. Z našich zkušeností víme, že může dojít k chronické infekci způsobené dvěma kmeny téhož druhu (Publikace č. 1). Byly popsány i koinfekce dvěma a více druhy z Bcc (32). Jsou popsány situace, kdy u pacienta dochází k nahrazení méně virulentního kmene kmenem virulentním (31).

Klinický průběh těchto infekcí je velice variabilní. V klinické praxi se můžeme setkat s pacienty, jejichž život není působením těchto bakterií významným způsobem ovlivňován, v tomto případě hovoříme o tzv. asymptomatickém, bezpříznakovém nosičství. Můžeme vidět

infekci vedoucí k pozvolnému zhoršování klinického stavu pacienta. Často jsou však tyto infekce charakteristické progresivním zhoršením klinického stavu pacienta, který vykazuje známky infekce: má zvýšené hladiny zánětlivých markerů, zvýšenou teplotu, kašel, dochází ke zvýšené produkci hlenu a pacient musí být hospitalizován za účelem podání intravenózní léčby. Hovoříme o tzv. plicní exacerbaci. Podáním léčby dochází ke zlepšení stavu, ale výše popsaný stav pacienta se opakuje. Postupně dochází k poškození plicního parenchymu a selhávání plic. Dojde-li k translokaci bakterií z plicního parenchymu do krevního řečiště doprovázené těžkou pneumonií, jedná se o terminální fázi infekce. Tento stav je znám jako cepacia syndrom (33). K tomuto stavu může dojít za různě dlouhou dobu od získání infekce, byly popsány situace, kdy k cepacia syndromu došlo za 9, 22 měsíců (30). Z vlastních zkušeností víme, že k němu může dojít během prvních dvou let, ale třeba i za 10 let od zisku infekce (osobní komunikace s MUDr. Liborem Filou, Ph.D, CCF ve FN v Motole, dospělá část, předběžné výsledky).

1.2.4. Prevalence a distribuce druhů Bcc v zahraničních centrech cystické fibrózy

Obecně lze říci, že prevalence Bcc u pacientů s CF je nízká: například v USA se pohybuje mezi 3 až 4 % (5), ve Spojeném království (UK) okolo 3,1% (34). Nicméně tyto údaje neplatí ve všech centrech cystické fibrózy. Na počátku 80. let 20. století v řadě center jako např. v Itálii (35), Portugalsku (36) nebo Kanadě (37) prevalence dosahovala od 7 do 30 %. Hlavní příčinou byl nedostatečný diagnostický servis, protože většina center měla málo zkušeností s těmito bakteriemi. Do této doby v centrech neexistoval separační systém pacientů na základě jejich mikrobiologického nálezu a navíc se pro tyto pacienty pořádaly společenské akce, které tak mohly přispět k šíření epidemických kmenů. Situace byla samozřejmě horší v centrech, kde se právě vyskytl epidemický kmen.

Mezi nejčastější druhy vyskytující se v populaci pacientů s CF patří *B. cenocepacia* a *B. multivorans*. Zatímco kmeny v rámci *B. cenocepacia* jsou zodpovědné za řadu závažných epidemií a jsou považovány za vysoce virulentní. V rámci *B. multivorans* se s kmeny vyvolávajícími epidemie setkáváme vzácně. Na začátku 90. let 20. století byl nejčastějším druhem *B. cenocepacia*, klinicky významné byly zejména fylogenetické podskupiny IIIA a IIIB.

Na základě nedávných epidemiologických studií prezentovaných v rámci setkání Mezinárodní pracovní skupiny pro bakterie komplexu *Burkholderia cepacia* (IBCWG) či posledních publikací (5), (34) se ve světě setkáváme s trendem nárustu druhu *B. multivorans*. V roce

2013 na meetingu IBCWG v Ann Arboru pracovní skupina z Belgie vedená P. Vandammem prezentovala 64% zastoupení právě *B. multivorans* mezi pacienty s CF infikovaných Bcc a výskyt dvou epidemických klonů v letech 2011 - 2012. Ve Francii se setkáváme od roku 1995 s vyšším zastoupením *B. multivorans* (38), který stále přetrvává, jak bylo prezentováno v roce 2011 na konferenci IBCWG v Praze. *B. cenocepacia* se majoritně vyskytuje v Kanadě, Itálii či Austrálii (39).

V americké populaci pacientů s CF jsou zastoupeny všechny druhy z Bcc kromě *B. ubonensis*. Jejich výskyt (kromě již zmiňovaných druhů *B. multivorans* a *B. cenocepacia*) není významný až na výjimku *B. dolosa* a její epidemický kmen rozšířený na dětském oddělení Centra cystické fibrózy (CCF) v Bostonu (40).

V posledních letech zejména díky identifikaci v roce 2009 se v některých centrech setkáváme s výskytem *B. contaminans* (41). Například v Argentině její zastoupení přesahuje 60 % (konference IBCWG v Praze, 2011), ve Španělsku se vyskytuje v 19 % všech izolátů od pacientů s CF (42). První popsáný druh z Bcc *B. cepacia* je dominantní v Portugalsku (32), byl popsán i ve Španělsku a Itálii (42, 43). Tabulka č. 2 shrnuje některé epidemiologické studie ať již publikované či prezentované na setkáních IBCWG.

Tabulka č. 2 Druhová distribuce Bcc v populaci pacientů s CF ve vybraných státech. Číselné údaje jsou uvedeny v %.

Stát	Dánsko	Francie	Španělsko	Itálie	N. Zéland	Argentina
Sledované období	1994-2006	2002-2009	1997-2010	1997-2003	2002-2007	2004-2010
Počet pacientů s CF	431	neuvedeno	neuvedeno	3791	400	500
Pacienti s Bcc infekcí	48	124	131	208	39	71
<i>B. cepacia</i>	-	-	11	8	-	-
<i>B. multivorans</i>	92	45	25	6	79	-
<i>B. cenocepacia</i>	6	39	24	61	13	14
<i>B. stabilis</i>	-	-	11	6	5	-
<i>B. vietnamiensis</i>	-	-	5	1	3	-
<i>B. contaminans</i>	-	-	19	-	-	66
ostatní druhy	2	16	5	18	-	20
informační zdroj	(44)	IBCWG Praha 2011	(42)	(43)	(45)	IBCWG Praha 2011

1.2.5. Epidemické kmeny Bcc

Epidemické kmeny mají schopnost šířit se mezi pacienty, což představuje hrozbu pro pacienty s CF. V současné době stále nepoznáme, jestli se daný kmen může šířit z pacienta na pacienta. Neexistuje totiž žádná metoda, která by jednoznačně identifikovala konkrétní marker transmisivity (přenosnosti), který by určil, že se jedná o kmen přenosný. Z dosud popsaných markerů transmisivity je BCESM (*Burkholderia cenocepacia* epidemic strain marker) prvně popsán u kmene *B. cenocepacia* J2315, ale ani tento marker není jednoznačným ukazatelem přenosnosti kmene (46). Proto na každý kmen pohlížíme jako na potenciálně přenosný a pacienty s infekcí Bcc od ostatních izolujeme. O tom, zda se jedná o kmen se schopností se šířit v populaci pacientů s CF, víme pouze na základě zkušeností z jiných center CF.

Obecně se předpokládá, že epidemické kmeny jsou více virulentní než kmeny s ojedinělým, sporadickým výskytem tzv. neepidemické kmeny. U několika epidemických kmenů byla popsána řada faktorů virulence, které se podílejí na vzniku infekce. Nejvýznamnější faktory virulence u Bcc jsou shrnuty v samostatné kapitole 1.2.8. Faktory virulence.

První epidemický kmen z Bcc, který byl identifikován pomocí multilokusové enzymové elektroforézy se označuje jako ET12 linie (elektroforetický typ 12) (47). Infikoval pacienty v Torontu, rozšířil se v centrech CF v Kanadě a díky pořádání mezikontinentálních letních táborů se rozšířil do Evropy do UK. ET12 linie ve skutečnosti nepředstavuje jeden kmen, ale díky zavedení genotypizační metody MLST bylo zjištěno, že se tato linie skládá z několika úzce příbuzných kmenů. Pomocí MLST se určilo, že se linie skládá ze 4 sekvenčních typů (ST). Kmeny pocházející od pacientů ze UK byly identifikovány jako jeden typ ST28, tři ET12 kmeny získané od pacientů v kanadských CCF se označily jako ST29, ST30, ST31 (48).

Dalšími epidemickými kmeny v rámci *B. cenocepacia* IIIA, které se rozšířily v Kanadě, se označují na základě fingerprintové metody genotypizace náhodné amplifikace polymorfních úseků DNA (RAPD) jako RAPD01, 04 a 06. Více informací o typizačních metodách v kapitole 1.3. Typizace bakterií. Z fylogenetické podskupiny IIIB se na východě USA rozšířil kmen označovaný PHDC (Philadelphia-DC) (49). Cesta přenosu zde není zcela jasná, protože se podařilo tento kmen izolovat z půdy a později byl objeven i v Evropě nejen u pacientů s CF (50). Ve státech Michigan a Ontario se rozšířil Midwest klon (51). Významný epidemický kmen druhu *B. multivorans* je kmen ST16 (48), který byl původně identifikován u pacientů s CF ve Francii (52), ale později byl nalezen v dalších 6 státech na 3 kontinentech i u pacientů bez CF. Lze ho tedy považovat za jeden z nejrozšířenějších kmenů způsobující infekci u pacientů s CF i bez CF.

Lokální epidemii způsobenou v CCF v Bostonu způsobil kmen *B. dolosa* SLC6. Přehled nejvýznamnějších epidemických kmenů je shrnut v Tabulce č. 3.

S výskytem epidemického kmene jsme se setkali i v pražském Centru cystické fibrózy (CCF) při Fakultní nemocnici (FN) v Motole, viz dále.

Tabulka č. 3 Přehled nejvýznamnějších epidemických kmenů v populacích pacientů s CF. UK Spojené království, USA Spojené státy americké, ČR Česká republika

Název	Druh	ST typ	Výskyt	Literární zdroj
Glasgow kmen Edinburg/C1576	<i>B. multivorans</i>	ST27	Glasgow, UK Edinburg	(53)
Francouzský kmen	<i>B. multivorans</i>	ST16	Francie	(20, 52)
ET12 linie/ RAPD02	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	ST28 ST29 ST30 ST31	UK Kanada Kanada Kanada	(20, 37)
RAPD01/CZ1	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	ST32	Kanada, ČR	(37)
PHDC	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	ST122	Filadelfie, USA	(49)
Midwest klon	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	ST40	USA, Michigan, Ohio	(20)
SLC6	<i>B. dolosa</i>	ST71 ST72	USA, Boston	(20, 54)
IST410	<i>B. contaminans</i>	ST96	Portugalsko	(20, 36)

1.2.6. Epidemiologická situace Bcc v CCF ve Fakultní nemocnici v Motole

V 90. letech 20. století došlo v největším CCF při FN v Motole k epidemickému šíření kmene z Bcc, který byl později potvrzen jako *Burkholderia cenocepacia* sekvenční typ 32 (ST32), dříve označován jako CZ1. V roce 1994 se v laboratořích Ústavu lékařské mikrobiologie (ÚLM) začalo nově vyšetřovat Bcc ve sputu pacientů s CF pomocí kultivace. V tomto roce bylo nově diagnostikováno 17 pacientů. První protiepidemické opatření spočívající v zákazu účasti infikovaných pacientů na společenských akcích a letních táborech pro pacienty s CF a jejich rodiče nezamezilo dalšímu šíření. Na základě dalších případů infekce Bcc vzrůstaly obavy z možnosti epidemického šíření v naší populaci pacientů s CF, které v té době nemohly být potvrzeny v důsledku nedostatečného diagnostického servisu, který by umožnil jednoznačnou identifikaci až na úroveň kmene. V roce 1998 jsme měli už přes 40 pacientů s infekcí Bcc. Ve stejném roce došlo k ukončení pořádání veškerých společenských akcí pro pacienty s CF a byla zřízena speciální ambulance pro pacienty s infekcí Bcc. V roce 2001

Laboratoř molekulární genetiky zavedla novou molekulárně genetickou metodu založenou na polymerázové řetězové reakci (PCR) umožňující detekci Bcc na úrovni druhu. Tento přístup potvrdil dominantní zastoupení *B. cenocepacia* fylogenetické podskupiny IIIA. O dva roky později byla provedena první rozsáhlá epidemiologická analýza izolátů od infikovaných pacientů s CF pomocí genotypizačních metod. Bylo definitivně potvrzeno, že čelíme závažné epidemii v populaci pacientů pražského CCF. Prevalence Bcc dosahovala 30 % a téměř u 90 % byl prokázán výskyt kmene CZ1 (55).

1.2.7. Mikrobiologická diagnostika Bcc ve Fakultní nemocnici v Motole

Diagnostika Bcc založená na klasické kultivaci pomocí selektivního agaru BCSA (*Burkholderia cepacia* selective agar) se v ÚLM vyšetřuje od roku 2001. Na tomto agaru rostou i bakterie nepatřící do tohoto komplexu, které se také mohou vyskytnout v plicním mikrobiomu CF, jako např. *Ralstonia* spp. Bakterie Bcc rostou na BCSA agaru velice pomalu, některé kmeny rostou v drobných koloniích a kultivace tak musí být prodloužena na 48 až 72 hodin. Během prodloužené kultivace jsou bakterie Bcc velice často přerůstány jinými bakteriálními druhy s rychlým růstem, například *Pseudomonas* spp. Identifikace založená na biochemických testech se dnes nepoužívá a je nahrazena hmotnostní spektrometrií ionizací laserem za přítomnosti matrice s detektorem doby letu (MALDI-TOF, matrix assisted laser desorption ionisation-time of flight) umožňující určit druh Bcc na základě proteinové analýzy ribozomálních proteinů bakterie.

V roce 2001 se do schématu diagnostiky začlenila molekulárně genetická metoda PCR umožňující amplifikaci genu *recA*, který je specifický pro Bcc. Pro účely detekce Bcc je PCR vypracována ve schématu nested, tedy je složená ze dvou kol PCR: v každém kole se k amplifikaci používá jiná dvojice primerů cíleně navržená na *recA* gen (56). Není-li část *recA* genu o délce 1 040 bp detekována pomocí gelové elektroforézy po prvním kole pomocí amplifikace „vnějších“ primerů, PCR produkt z prvního kola se použije do reakce v kole druhém, ve kterém se využívají „vnitřní“ primery amplifikující produkt o délce 620 bp. Toto schéma zajišťuje zvýšenou citlivost metody v době, kdy je daný patogen přítomen v klinickém materiálu v nízké koncentraci, a tedy běžnými kultivačními metodami nezachytitelný. Takto nastavený systém vyšetření umožňuje diagnostiku na úrovni komplexu. Pro klinické účely je tato diagnostika velice přínosná, nicméně ne zcela dostačující. Neinformuje nás o druhové, ani kmenové příslušnosti Bcc patogenu. Před zavedením genotypizačních metod v Laboratoři molekulární genetiky (LMG) Pediatrické kliniky a

Ústavu lékařské mikrobiologie (ÚLM) se k určení druhu využívalo „třetí“ kolo PCR určené ke stanovení genomvarů tzv. genomvarizační reakce, ve kterém se za pomoci druhově specifických primerů pro prvních 7 genomvarů určil příslušný druh. Nicméně se zvyšujícím se počtem druhů v Bcc a zavedením MLST, tato třetí PCR pozbyla významu, viz kapitola Speciální část, kapitola 3.

1.2.8. Faktory virulence

Bcc produkují mnoho faktorů virulence, ale u některých z nich stále není přesně známa jejich úloha v mechanismu patogeneze onemocnění. Genomické ostrovy patogenity hrají významnou roli ve virulenci bakterií. Obsahují řadu mobilních elementů, které ovlivňují expresi genů nacházejících se v těchto oblastech. Například u kmene *B. cenocepacia* J2315 byl objeven ostrov patogenity *cci* dlouhý 32 kb, který obsahuje řadu genů. Mezi ty nejvýznamější z nich patří geny pro Quorum sensing systém a gen pro negativní regulátor transkripce *esmR*, který je součástí oblasti tzv. BCESM sloužící jako marker transmisivity (46).

Druh *B. cenocepacia* byl nejvíce zastoupený v populacích pacientů s CF v 80. a 90. letech 20. století a z tohoto důvodu je také nejvíce prostudovaným druhem z hlediska patogeneze a faktorů virulence, které se podílejí na schopnosti vyvolat infekci v hostiteli.

Pomocí cílené mutagenese a studií genové exprese bylo popsáno více jak 100 genů potřebných k přežití *B. cenocepacia* v hostitelském organismu (57), patří mezi ně geny kódující proteiny různorodých funkcí, jako jsou například proteiny regulační, transportní, proteiny metabolismu, účastníci se biogeneze povrchu buněk či neznámých funkcí (58). Nejvýznamnější faktory jsou krátce shrnuty níže.

Alternativní sigma faktory a příbuzné proteiny.

Alternativní sigma faktory a příbuzné proteiny jsou regulační proteiny aktivující transkripci genů vazbou na oblast promotoru a interakcí s RNA polymerázovým komplexem umožní iniciaci transkripce. Mezi tyto proteiny patří RpoE a RpoN. RpoE je potřebný k růstu *B. cenocepacia* při stresových podmínkách (vysoká teplota, vysoká osmolarita). RpoN je nezbytný k tvorbě biofilmu a motilitě (57).

Sekreční systémy

Sekreční systémy umožňují vylučování efektorových molekul, které přispívají k rozvoji onemocnění hostitele. U *Bcc* byly popsány zejména tři systémy, které se podílejí na onemocnění hostitelů. Sekreční systém III je důležitý pro přežití *B. cenocepacia* u myši. Snížení počtu bakterií u infekcí mutantů tohoto systému došlo ke snížení populace o 2 – 3 logaritmické jednotky. Sekreční systém IV je nezbytný k rozvoji infekce u cibule, k intraculelárnímu přežití v epiteliálních buňkách a makrofázích (57).

Quorum sensing systém (QSS)

QSS představuje mezibuněčnou komunikaci pomocí molekul produkovaných bakteriálními buňkami. Regulace je zprostředkována na základě hustoty bakteriální populace. Bakterie produkují sloučeniny, které se akumulují na vnější straně buněk a jakmile je překročena bakteriální hustota, koncentrace difúzních sloučenin překročí svůj práh a bakterie změní expresi některých genů, které do té doby nebyly aktivovány. QSS se skládá ze dvou hlavních složek, sloučenin N-acyl-homoserin laktonů (AHLs) a receptoru, který detekuje AHLs (9).

Prvně popsaný systém u *Bcc* byl CepIR (59). Volné difusibilní sloučeniny AHL jsou syntetizovány CepI syntházou a následně jsou detekovány transkripčním regulátorem CepR, který reguluje expresi různých genů pro tvorbu biofilmu, motilitu, produkci proteáz, syntézu sideroforů (60-62). Druhým QSS popsaným u *B. cenocepacia* byl CciIR systém, který byl popsán prvně u kmenů epidemické linie ET12 (60). Nachází se v genomickém ostrově *cci* (46). AHL syntáza CciI produkuje sloučeniny, které se váží na receptor CciR. Systém CciIR spolupracuje se systémem CepIR (61). CepR je pozitivní regulátor, CciR reguluje genovou expresi negativně. Oba QSS kontrolují produkci biofilmu (62).

U druhu *B. vietnamiensis* se zjistilo, že systém CepR ke genové expresi vyžaduje další QSS označovaný jako BviIR (63).

Biofilm

Biofilmy představují bakteriální společenství, která chrání bakterie před účinkem antibiotik a imunitním systémem hostitele (64). U *Bcc* jsou biofilmy v úzké součinnosti s produkcí AHL. Geny, které jsou potřebné pro vyzrávání biofilmů u *Bcc*, jsou geny kódující povrchové proteiny, geny účastníci se biogeneze a udržování integrity vnější membrány a geny kódující regulační faktory ovlivňující produkci AHL (9). Biofilmy a QSS se staly cílem pro výzkum nových antibiotických léčiv (65).

Rezistence k antibiotikům

Za další z virulentních faktorů Bcc může být považovaná přirozená rezistence k antibiotikům. Bcc jsou přirozeně rezistentní k aminoglykosidům, chloramfenikolu, chinolonům a β -laktamům. Důvodem těchto rezistencí jsou enzymové mechanismy inaktivace antibiotik prostřednictvím enzymů β -laktamázy, dihydrofolát reduktázy a enzymů inaktivujících aminoglykosidy. Další mechanismy jsou alterace cílových struktur antibiotik, snížená propustnost vnější membrány a aktivní efluxové systémy (66).

Lipopolysacharid (LPS)

LPS představuje virulentní faktor mnoha gramnegativních bakterií, který je složen z lipidu A, oligosacharidové složky a O-antigenu. LPS se uvolňuje z buněčné stěny bakterie po jejím zániku a způsobuje aktivaci složek imunitního systému a komplementu. V případě Bcc bylo zjištěno, že aktivita LPS je rozdílná v porovnání s například u *P. aeruginosa*. LPS u Bcc je 4 - 5 krát více endotoxický než u PA, indukuje zvýšený počet neutrofilů, zvyšuje produkci interleukinu 8 z epiteliálních buněk. První EPS, který byl u Bcc popsán se nazývá cepacian (57).

Bičíky a fimbrie

Bičík představuje důležitý faktor virulence, který bakterii umožňuje nejen pohyb, ale slouží jako adhezín a umožňuje bakterii proniknout do hostitelských buněk.

U kmenů ET12 linie byly objeveny specifické fimbrie označované jako cable pili, které ve spojení s adhezínem AdhA hrají nezbytnou roli při invazi respiračním epitelem (67).

Mezi další faktory virulence u Bcc řadíme extracelulární produkty jako jsou lipázy, proteázy, hemolysiny či siderofory.

1.3. Typizace bakterií

Typizace či identifikace bakterií na úroveň kmene je velice důležitá při stanovení prognózy infekce, při léčbě, monitorování epidemiologické situace a včasného zásahu nastavením protiepidemických opatření. Důležitá je zejména u bakterií, které se podílejí na vzniku nozokomiálních nebo pandemických infekcí, u vysoce rezistentních či vysoce virulentních bakterií. V dnešní době lze typizaci bakterií provádět dvěma způsoby, a to pomocí fenotypizace a/nebo genotypizace.

Každá typizační metoda je charakterizovaná několika kritérii, která určují vhodnost použití metody pro konkrétní mikroorganismus:

- I. **typovatelnost** – schopnost metody vytvořit jednoznačný výsledek (fingerprint) pro jeden konkrétní kmen
- II. **reprodukovatelnost** – opakovaným testováním dané metody musí vzejít téměř totožný výsledek
- III. **rozlišovací schopnost** – vyjadřuje pravděpodobnost s jakou lze rozlišit nepříbuzné izoláty, kmeny nemající epidemiologický vztah
- IV. **jednoduchost provedení** – zohledňuje technickou a finanční náročnost metody
- V. **snadná interpretace** – jednoduché zhodnocení výsledku (68).

1.3.1. Fenotypizace

Fenotypizační metody k rozlišení kmenů používají charakterizaci produktů genové exprese, jako je stanovení biochemické produkce, přítomnosti antigenů na povrchu buněk (serotypizace), antimikrobiální citlivosti, popis morfologických vlastností (velikost kolonií, vzhled kolonií) nebo proteinové produkce. Produkty genové exprese se mohou měnit v závislosti na růstových podmínkách, fázi růstu a spontánní mutaci (69). Nicméně tyto metody trpí nízkou reprodukovatelností a/nebo relativně nízkou rozlišovací schopností, a tak nejsou schopny rozlišit úzce příbuzné druhy, natož pak jednoznačně identifikovat konkrétní kmen, tak jak tomu je v případě Bcc. Proto je nutné se v těchto případech zaměřit na identifikaci pomocí genotypizace.

1.3.2. Genotypizace

Při použití genotypizačních metod se k identifikaci využívá genetického obsahu mikroorganismů – deoxyribonukleové kyseliny (DNA). Každá genotypizační metoda vytváří určitý profil kmene či izolátu tzv. fingerprint a na jejich základě dochází k odlišení či konfirmaci kmenové příslušnosti jednotlivých izolátů a určení jejich genetické příbuznosti. Někdy se tyto metody také nazývají fingerprintové (68). Genotypizační metody jsou méně ovlivnitelné přirozenou variabilitou, ačkoliv mohou být ovlivněny insercí či delecí DNA v chromozomech, získáním či ztrátou extrachromozomální DNA nebo náhodnou mutací (69). Nevýhodou těchto metod je, že neexistuje žádná univerzální metoda pro všechny mikroorganismy. Je tudíž nezbytné pro daný mikroorganismus experimentálně testovat vhodnost dané metody na dostatečně velkém panelu, jak klinických, tak enviromentálních izolátů, abychom spolehlivě odlišili genetickou příbuznost.

Rozdělení genotypizačních metod

V současné době lze genotypizační metody na základě jejich principu rozdělit do tří kategorií:

1. **Tvořící DNA fragmenty** - metody, u kterých je bakteriální profil porovnáván na základě velikosti vzniklých DNA fragmentů vytvořených amplifikací a/nebo enzymatickým štěpením genomické DNA.
2. **DNA sekvenační** – studující polymorfismus DNA na základě pořadí nukleotidů
3. **DNA hybridizační** (68)

1. Metody tvořící DNA fragmenty

Fingerprintový profil izolátů je tvořen DNA fragmenty, které vznikají naštěpením genomické DNA restrikčními enzymy, DNA amplifikací nebo kombinací obou způsobů.

K těmto metodám řadíme **makrorestrikční štěpení genomové DNA** s následnou elektroforézou v pulzním poli (PFGE, pulsed field gel electrophoresis). Tento přístup je považován za zlatý standard genotypizačních metod. Bakteriální DNA je naštěpena restrikčním enzymem s malý počtem restrikčních míst, čímž dojde k vytvoření různě dlouhých fragmentů DNA (10 – 1000 kb), které jsou separovány v pulzním poli. PFGE poskytuje vysokou rozlišovací účinnost, reprodukovatelnost a k jejímu zhodnocení existují kritéria tzv. Tenoverova usnadňující interpretaci výsledků (70). Nevýhodou metody je vyšší

cena a časová náročnost. Provedení této metody trvá 3 – 4 dny. Používá se k typizaci *Pseudomonas aeruginosa* (71), *Haemophilus influenzae* (72), *Enterobacteriaceae* (73).

Další metoda, při které se využívá restriční enzym k naštěpení DNA je **ribotypizace**. Tradiční **ribotypizace** spočívá v naštěpení genomické DNA restričním enzymem s vyšším počtem restričních míst (rozdíl od PFGE), následně je DNA separována elektroforézou a po Southern hybridizaci se pomocí značených sond detekují restriční fragmenty, které obsahují geny pro ribozomální RNA (rRNA). Výsledkem je fingerprintový profil – ribotyp, který obsahuje fragmenty, jejichž počet odráží četnost rRNA operonů v bakteriálním druhu. Tyto geny se v genomu nacházejí v několika kopiích, počet je stabilní a navíc sekvence pro rRNA jsou konzervativní. Nevýhodou metody je časová náročnost, složité zpracování a nižší mezilaboratorní reprodukovatelnost (74). Přenos manuálního provedení ribotypizace do automatizovaného provedení RiboPrinter Microbial Identification systému výrazně zlepšil její reprodukovatelnost. Ribotypizace je vhodná pro genotypizaci *E. coli* (75), *Salmonella* spp. (76). Jiná varianta ribotypizace byla vyvinuta 90. letech 20. století. Jedná se o tzv. **PCR ribotypizaci** (77). Nevyužívají se značené sondy, ale primery komplementární k oblastem rRNA operonu. Více o této metodě je uvedeno viz dále.

Metoda **náhodné amplifikace polymorfních úseků DNA** (RAPD, random amplified polymorphic DNA) je založena na amplifikaci polymorfních úseků pouze jedním krátkým primerem (10 nukleotidů) s následnou elektroforetickou separací. Tato metoda je považována za nereproducibilní z důvodu obtížné separace fragmentů pomocí gelové elektroforézy, ale tento názor se začíná přehodnocovat například u Bcc. Tuto metodu je potřebné testovat na dostatečně velkém panelu izolátů, metoda není vhodná pro všechny bakteriální druhy například *Brucella* spp. (osobní komunikace s dr. O'Callaghanem, Lékařská fakulta v Montpellier a Národní institut pro zdraví a lékařský výzkum v Nimes). Úspěšně byla použita k odlišení rezistentních a citlivých kmenů *Moraxella catarrhalis* (78). Používá se i ke genotypizaci kmenů *Lactobacillus* spp. (79).

Mezi další metody založené na vytvoření fingerprintového profilu pomocí amplifikace úseků DNA s následnou elektroforetickou separací vzniklých fragmentů patří **rep-PCR** (repetitivní extragenové palindromické-PCR) metody. Patří mezi ně **REP-PCR**, **ERIC-PCR**, **BOX-PCR** a **GTG-PCR**. K amplifikaci se používají primery, které jsou komplementární k repetitivním sekvencím a amplifikují různorodé DNA oblasti v genomu bakterií ohraničené

repetitivními sekvencemi. Ačkoliv význam těchto elementů není přesně znám, slouží jako užitečný nástroj ke genotypizaci bakterií. Historicky první popsáný repetitivní element byl repetitivní extragenový palindrom (REP) (80). Využívá se ke genotypizaci například u *Escherichia coli* (81),(82) či *Stenotrophomonas maltophilia* (83). REP elementy jsou sekvence dlouhé 35 až 40 bp. BOX-PCR byla poprvé popsána u izolátů *Streptococcus pneumoniae* (84) a amplifikuje DNA oblasti mezi BOX elementy, ty jsou dlouhé 154 bp. Úspěšně byla aplikována i u jiných organismů: například u enterokoků (85). ERIC-PCR amplifikuje oblasti mezi ERIC elementy (enterobakteriální repetitivní mezigenová shoda), které byly prvně popsány u *E. coli*, *Salmonella typhimurium* a *Enterobacteriaceae* (86) a jsou dlouhé 124 – 127 bp. Dnes se ERIC-PCR využívá u typizace *Lactobacillus* spp. (87, 88) Posledním zástupcem repetitivních elementů jsou polytrinukleotidové sekvence GTG. Těchto elementů se využívá k typizaci u *Acinetobacter baumannii* (89), *Salmonella enterica* (90), *Streptococcus mutans* (91). Rep-PCR metody jsou jednoduché a mají dobrou reproducibilitu. Existuje komerčně dodávaný kit DiversiLab (BioMérieux) pro rep-PCR typizaci, který zvyšuje reproducibilitu metody, naopak nevýhodou je vyšší pořizovací cena.

Metoda kombinující restriční štěpení a amplifikaci vzniklých fragmentů s vysokou rozlišovací schopností je **délkový polymorfismus amplifikovaných fragmentů** (AFLP, amplified fragment length polymorphism). Princip je založen na selektivní amplifikaci fragmentů DNA vzniklých restričním štěpením jednoho či dvou enzymů. Před amplifikací jsou k fragmentům připojeny adaptory se sekvencemi komplementárními k fluorescenčně značeným primerům, po amplifikaci dochází k separaci DNA fragmentů pomocí sekvenační aparatury. AFLP je vhodná například k typizaci kmenů *Chlamydia pneumoniae* (92) nebo multirezistentních kmenů *Acinetobacter baumannii* (93).

2. DNA sekvenační

Největší výhodou sekvenačních metod je jejich reproducibilita, jelikož podstata metody je založena na určení pořadí nukleotidů v DNA sekvencích, které jsou jednoduše uloženy v databázích, které jsou volně dostupné na internetu a lze je tedy snadno mezilaboratorně porovnávat. V dnešní době existují dva sekvenační přístupy – Sangerovo sekvenování a sekvenování nové generace. Pomocí těchto metod sekvenujeme jak kódující, tak nekódující oblasti.

První z genů, který se sekvenuje, je vysoce konzervativní housekeepingový gen **16S rRNA** (gen pro malou ribozomální podjednotku). Housekeepingové geny představují geny nezbytné pro život bakterií a dochází v nich k minimálnímu počtu mutací. Nachází se ve všech bakteriích a délka genu 1 500 bp je dostatečně dlouhá, aby poskytla relevantní informace. Ribozomální RNA se účastní syntézy proteinů a je velice důležitá pro přežití buněk. Sekvenování tohoto genu se využívá k identifikaci a fylogenetické klasifikaci prokaryotních druhů, rodů a rodin. Tento gen je tak vysoce konzervovaný, proto ho nelze využít k určení bakterií až na úroveň kmene, s výjimkou několika druhů jako je *Neisseria meningitidis* (94), *Mycoplasma bovis* a *agalactiae* (95).

Další geny, které se používají k typizaci, většinou kódují povrchové proteiny či faktory virulence. Variabilní oblast genu **slpA** kódující protein povrchové vrstvy u *C. difficile* představuje alternativu k serotypizaci, protože sekvence ve variabilní oblasti jsou identické uvnitř jedné seroskupiny, ale jsou rozdílné mezi seroskupinami navzájem (96). Sekvenováním polymorfismů v oblasti X genu pro protein A (**spa** gen) se používá k typizaci kmenů *S. aureus* (tzv. spa typizace). Gen **gyrB** (DNA gyráza podjednotka B) poskytuje lepší stupeň rozlišení než gen 16S rRNA u kmenů *Acinetobacter* (97) a u *Pseudomonas* spp., u něhož může sloužit jako cílový gen k detekci u *Pseudomonas aeruginosa* (98). Ani tyto geny však nejsou schopny bakterie identifikovat až na úroveň kmene, pouze případně jako je spa typizace u *S. aureus* (99).

Nejelegantnější metodou sekvenující kódující oblasti je **multilokusová sekvenční typizace** (MLST, multilocus sequence typing), která je založená na amplifikaci a následné sekvenaci housekeepingových genů (většinou jich je 7). Jedná se opět o geny konzervativní, ve kterých dochází k minimálnímu počtu mutací a v genomu bakterií by se měly vyskytovat v jedné kopii. Porovnáním sekvencí se světovými databázemi MLST sekvencí (<http://www.mlst.net> a <http://www.pubmlst.org>) získáme sekvenční typ (ST) konkrétního kmene, který je tvořen sedmičíselným alelickým profilem jednotlivých genů. MLST není vhodná pro všechny druhy, například pro *Mycobacterium tuberculosis* (100). Jedná se totiž o geneticky uniformní druh, takže by toto typizační schéma rozdělilo celý druh do několika málo ST typů. Geneticky uniformní druhy představují druhy s nízkým stupněm polymorfismů v genech. U těchto druhů dochází vzácně ke genetickým změnám (horizontální genetická výměna, rekombinace, mutace), které by zvyšovaly variabilitu v housekeepingových genech - jedná se o evolučně mladé druhy (101). Podobná uniformita v housekeepingových genech se objevuje u *Yersinia*

pestis (102), *Bacillus anthracis* (103), *Bordetella pertussis* (104). MLST se využívá při dlouhodobém epidemiologickém sledování např. celosvětově rozšířených klonů, které byly izolovány v různých státech.

Novou variantou MLST je **ribozomální MLST** (rMLST) umožňující taxonomické členění a typizaci na základě variability v 53 genech, které kódují bakteriální ribozomální proteinové podjednotky (*rps* geny). Geny *rps* představují ideální cíl k univerzální charakterizaci, protože jsou přítomny ve všech bakteriích, jsou distribuovány po celém chromozomu a kódují proteiny, které jsou pod stabilizační selekcí pro zachování funkce. Obecně lze říci, že *rps* geny představují variabilitu, která rozdělí bakterie na všech taxonomických úrovních, ve většině případů až na úroveň kmene, protože poskytuje významně vyšší rozlišení než gen pro 16S rRNA. K druhové identifikaci postačí kompletní sekvence několika jednotlivých genů *rps*, zatímco k typizaci na úroveň kmene je potřeba skupina genů v závislosti na druhu. Například u geneticky uniformních druhů je potřeba znát sekvence všech *rps* genů. Oproti tomu u vysoce rekombinantních druhů jako je například *Helicobacter pylori* postačí ke ganotypizaci 7 genů jako u MLST. U jednotlivých druhů mají určité geny vyšší rozlišovací schopnost než jiné (105).

K sekvenčním metodám zaměřeným na nekódující oblasti patří například **analýza ribozomálního mezigenového prostoru** (RISA, ribosomal intergenic spacer analysis). Jedná se o variantu ribotypizace, která je zmiňovaná dříve ve skupině metod tvořící DNA fragmenty. RISA zahrnuje amplifikaci pomocí PCR oblasti genového operonu rRNA mezi malou (16S) a velkou (23S) ribozomální podjednotkou tzv. ISR (intergenic spacer region, mezigenová oblast), nebo též ITS (internal transcribed spacer, vnitřně transkribovaná oblast). Následná sekvenace ITS se může využít k typizaci baktérií (106). Většina rRNA operonu kóduje strukturální funkce, část oblasti mezi 16S a 23S může kódovat transferové RNA (tRNA) v závislosti na bakteriálním druhu. Taxonomický význam ISR leží ve významné heterogenitě jak v délce, tak v pořadí nukleotidů v této oblasti. Délka ISR může dosahovat délky od 150 do 1500 bp, s průměrnou délkou mezi 150 a 500 bp. Tímto způsobem můžeme získat rychlou představu o mikrobiální diverzitě a složení společenstva bez nutnosti použití kultivačních metod. Prvně byla použita ke studiu mikrobiální diverzity půd v amazonských pralesech (107). Lze ji aplikovat ke studiu polymikrobiálního charakteru infekcí přímo z klinického materiálu.

Sekvenování celých bakteriálních genomů pomocí sekvenování nové generace by umožnilo určit kmen pomocí nukleotidového pořadí, ale vysoké finanční náklady a časová náročnost způsobují, že ho nelze v rutinní praxi genotypizačních laboratoří využít. Problémem sekvenování celých genomů by pravděpodobně byla interpretace získaných dat. V případech, kdy bychom osekvenovali časosběrné izoláty od jednoho pacienta, který je infikován stejným kmenem na základě MLST, zřejmě dojdeme při celogenomovém srovnání k tomu, že se izoláty budou v určité míře od sebe lišit díky plasticitě genomů. Potom bude obtížné stanovit definici, v jakém případě se jedná o tentýž kmen a kdy už se jedná o úzce příbuzný kmen. Spíše než celogenomové sekvenování k typizaci bakterií je lépe aplikovatelný systém výběru genů charakterizující daný druh na úroveň kmene jako jsou schémata pro MLST či rMLST.

3. DNA hybridizační

DNA hybridizační metody se využívají k detekci mutací v DNA pomocí komplementárních hybridizačních sond. Hybridizační sondy jsou fluorescenčně značené fragmenty o známé DNA sekvenci, přičemž cílová DNA představuje nukleovou kyselinu, kterou studujeme. Pomocí arrayů můžeme testovat stovky až desetitisíce fragmentů DNA. Rozlišujeme DNA makroarraye, DNA mikroarraye a cDNA mikroarraye (68). Příkladem genotypizace pomocí DNA mikroarraye je AT (Alere Technologies) array navržená pro *Pseudomonas aeruginosa* (PA). Typizace PA je založena na hybridizaci značené genomické DNA k sondám, které představují konzervativní a variabilní oblasti v genomu PA. Na základě signálu hybridizovaných DNA k sondám se charakterizuje nejčastější genotypy PA (108).

DNA makroarraye nabízejí rychlou, specifickou a cenově dostupnou genotypizační metodu, aplikují se zejména k detekci genů podílejících se na antibiotické rezistenci, například u *Mycobacterium tuberculosis* a detekce rezistence k rifampicinu (109).

DNA mikroarraye se staly užitečným nástrojem v oblasti studia bakteriálního transkriptomu a genetické diverzity.

II. SPECIÁLNÍ ČÁST

2. UŽITEČNOST NESTED PCR DETEKUJÍCÍ BAKTERIE KOMPLEXU *BURKHOLDERIA CEPACIA* Z KLINICKÉHO MATERIÁLU

Cíl: Zhodnocení užitečnosti nested *recA* PCR metody, která se v CCF ve FN v Motole využívá v rutinní diagnostice Bcc.

Důvod: Odpověď na otázky: Je PCR schopna detekovat Bcc v klinickém vzorku dříve než kultivační metody? Má význam vyšetřovat vzorky sputa současně dvěma metodami, tj. PCR i kultivačně?

Autorská publikace k tématu: Publikace č. 2

V první kapitole Speciální části této dizertační práce se věnujeme zhodnocení užitečnosti vyšetřovací metody nested PCR, která byla v CCF ve FN v Motole zavedena do rutinního provozu v květnu 2001. Od tohoto zavedení se každý materiál od pacientů s CF vyšetřuje dvěma způsoby. Prvním způsobem jsou kultivační metody a druhý způsob je molekulárně genetická metoda PCR navržená na gen *recA*, který je specifický k detekci Bcc. Od roku 1994 do konce dubna 2001 se klinický materiál vyšetřoval pouze kultivačními metodami.

2.1. Metodika

Abychom zhodnotili význam *recA* PCR určené k detekci Bcc z klinického materiálu, zanalyzovali jsme celkem 6 109 klinických vzorků od 299 pacientů s CF, kteří navštěvovali CCF alespoň 2 krát ročně během období květen 2001 až konec roku 2010. Všechny klinické vzorky byly vždy současně testovány jak PCR, tak kultivačně. Diagnóza infekce způsobená Bcc byla stanovena u všech pacientů s nejméně 2 pozitivními vzorky, které byly odebrány od pacienta v jiný časový okamžik. Pozitivita byla určena jednou z používaných metod.

Určení kmenové příslušnosti jsme provedli pomocí genotypizačních metod RAPD a/nebo MLST, kterým je věnována první část další kapitoly.

2.2. Výsledky

Podrobnou analýzou všech vzorků jsme zjistili, že od roku 1994 do roku 2010 mělo 93 pacientů infekci Bcc. Zjednodušené schéma získaných výsledků je zakresleno ve Schématu č.

1. Před rokem 2001 bylo v CCF ve FN v Motole 54 pacientů infikovaných Bcc. Za období květen 2001 až prosinec 2010, kdy vzorky byly podrobeny vyšetření oběma metodami, jsme nově stanovili infekci Bcc u 39 pacientů.

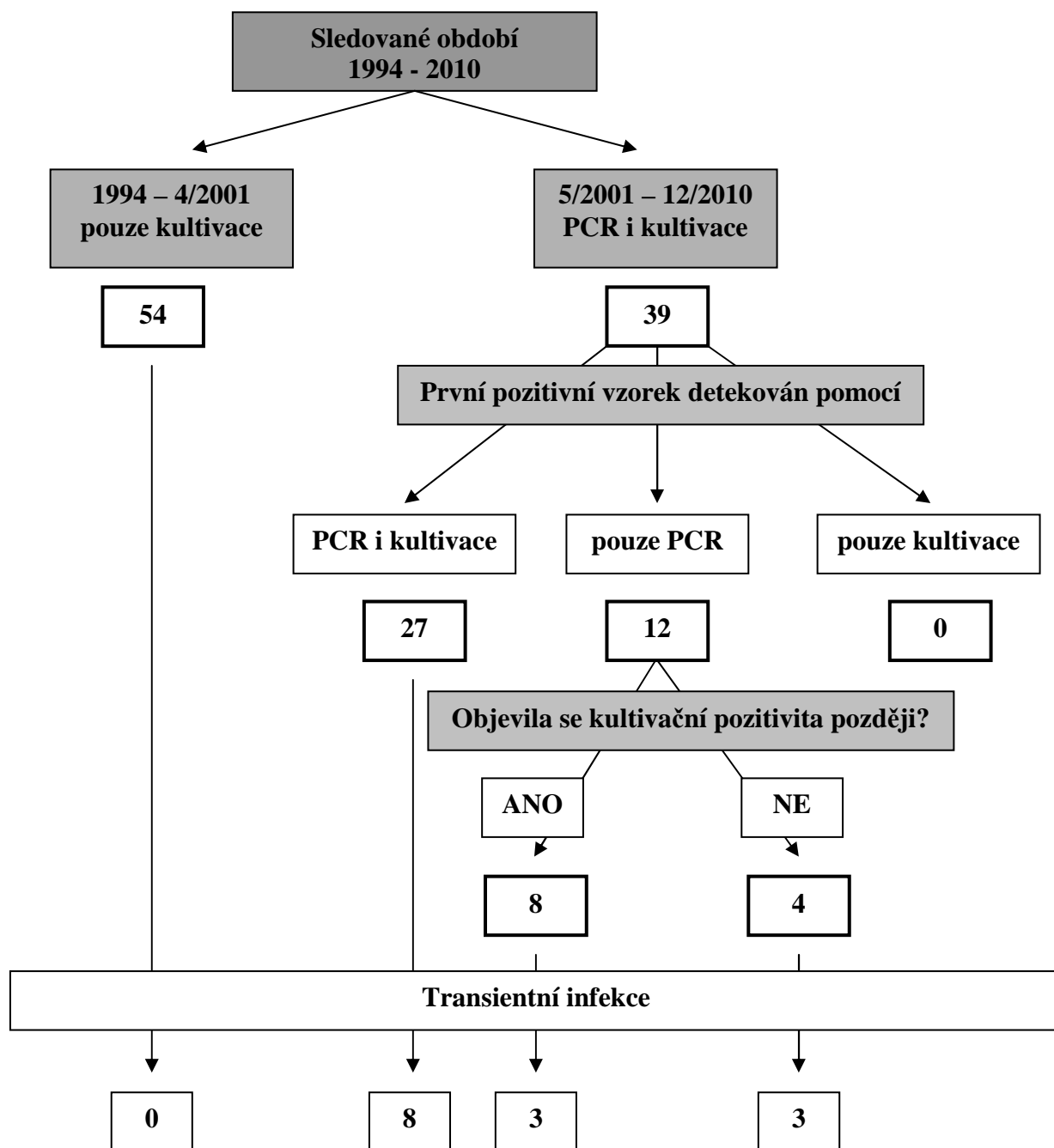
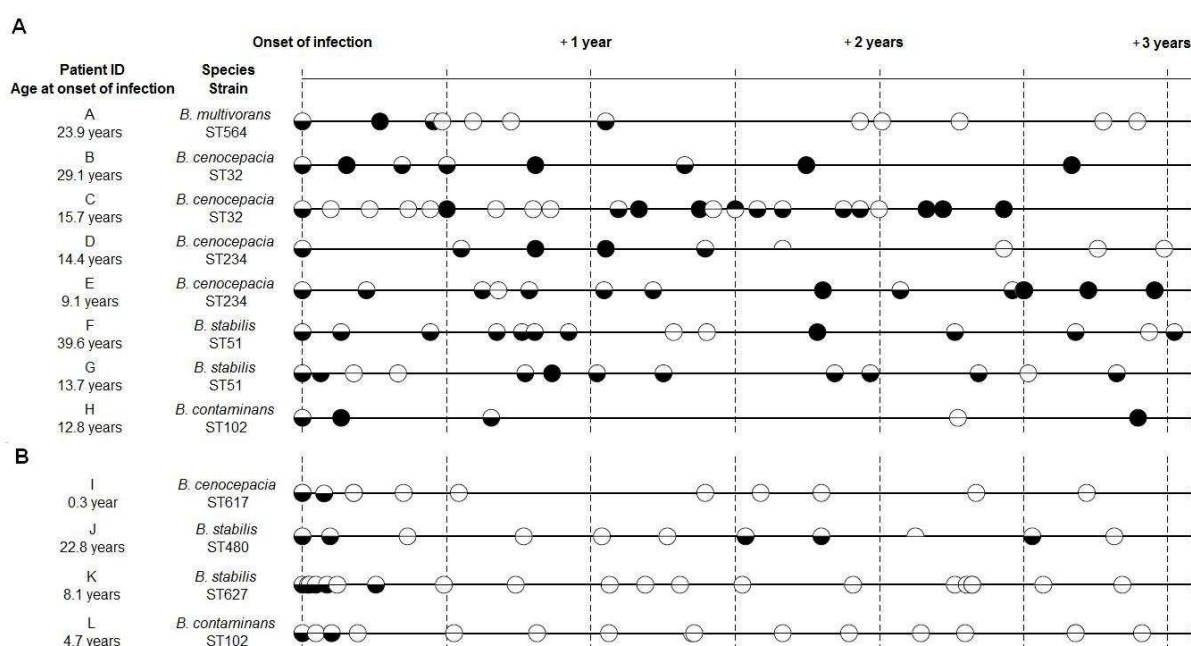


Schéma č. 1 Schématické znázornění výsledků diagnostiky infekce Bcc za období 1994 až duben 2001 a květen 2001 až prosinec 2010, určení metody, která diagnostikovala infekci jako první s výskytem transientních infekcí.

Zjišťovali jsme, jakou metodou byl první pozitivní vzorek detekován. Pomocí obou metod (PCR, kultivace) byla pozitivita stanovena ve 27 případech. U 12 pacientů (31 %) z 39

pacientů s infekcí Bcc byla první pozitivita stanovena pouze metodou PCR, kultivačně byly tyto vzorky negativní. U těchto 12 pacientů jsme došetřovali, za jak dlouho od první positivity se objevila i pozitivita kultivační, tedy o kolik měsíců dříve je PCR metoda schopna detekovat Bcc oproti kultivaci. Časový interval se pohyboval v rozmezí od 1 až 22 měsíců u 8 pacientů, u 4 pacientů se kultivační pozitivita nikdy neobjevila. Obrázek č. 1A a 1B (Publikace č. 2) představuje shrnutí longitudinálních výsledků u pacientů, jejichž infekce Bcc byla prvně diagnostikována pomocí PCR. V případě A) se jedná o pacienty, u nichž se později přidala kultivační pozitivita, B) pacienti, jejichž pozitivita byla detekována pouze PCR.



Obrázek č. 1A, B Shrnutí longitudinálních vyšetření pacientů s infekcí Bcc, jejichž infekce byla prvně diagnostikována pouze PCR. Vyšetření jsou seřazena na základě prvního pozitivního vzorku. Průběh zobrazuje následující 3 roky infekce od první positivity. Pozitivita vzorku je znázorněna černě zbarvenou částí kruhu. Horní polovina kruhu představuje kultivační vyšetření, dolní polovina vyšetření PCR. (Obrázek použit z Publikace č. 2)

Ve skupině pacientů, u kterých se kultivační pozitivita nikdy neobjevila (Obr. č. 1B), došlo po určité době k vymizení infekce, jednalo se o transientní infekci. Tu jsme pozorovali u 3 pacientů ze 4. Celkově jsme se za dané období (1994-2010) setkali s transientní infekcí u 15 % (14/93) pacientů infikovaných Bcc. Přehled druhů Bcc a typů ST, které způsobily transientní infekci je shrnut v Tabulce č. 4.

Tabulka č. 4 Druhová a kmenová distribuce transientních infekcí s délkou trvání infekce. Označení pacientů A, D, F, I, K, L odpovídá pacientům na Obrázku č. 1A, B. Tabulka použita z Publikace č. 2.

Pacient	Infekce		Trvání infekce (měsíce)
	Druh	Kmen	
M	<i>B. multivorans</i>	ST181	2,5
A		ST564	13
N	<i>B. cenocepacia</i> IIIA	ST612	4
D		ST234	17
I	<i>B. cenocepacia</i> IIIB	ST617	2
O	<i>B. stabilis</i>	ST627	3
K		ST627	3
P		ST653	3,5
Q		ST627	13
F		ST51	37
L	<i>B. contaminans</i>	ST102	2
R		ST102	7
S		ST482	13
T		ST102	20

2.3. Diskuze

Na základě této studie můžeme konstatovat, že metoda PCR detekující Bcc ze vzorků sput od pacientů s CF hraje významnou roli v diagnostice těchto infekcí. Odhalení infekce o 1 až 22 měsíců dříve než kultivační metody u 31 % pacientů s infekcí Bcc (diagnostikovaných v období 2001-2010) je bezesporu přesvědčivý argument, proč tuto diagnostiku v praxi nadále používat.

Díky včasné diagnóze pomocí PCR a aplikací izolačního systému (dříve publikován Dřevínkem et al. (55) a Vošahlíkovou et al. (71)) jsme byli schopni ochránit naše pacienty před šířením infekce způsobené epidemickým kmenem *B. cenocepacia* ST32. Ve dvou případech totiž PCR metoda detekovala přítomnost epidemického kmene o 1 měsíc, v druhém případě o 6 měsíců dříve než kultivace (Obrázek č. 1A, pacient B a C). U pacienta C (Obrázek č. 1A) byla následující vyšetření negativní a až po 6 měsících jsme opět zaznamenali další pozitivitu. Tento jev není ojedinělý, vysvětlujeme si ho zejména tím, že na počátku infekce může být množství přítomných bakterií nízké, určitě k tomu přispívá i kvalita vzorku a homogenita v rozložení patogenu ve vzorku. Musíme si také uvědomit, že sputum nereprezentuje skutečný obraz mikrobiálního složení v celých plicích, ale jen v určité části. Musíme s tímto jevem ojedinělých negativit a pozitivit počítat, a proto je nutné provádět longitudinální sledování a teprve poté provádět interpretaci infekce.

U pacienta J (Obrázek č. 1B) bychom o jeho infekci neměli žádné povědomí téměř 3 roky, protože jeho kultivační nálezy byly negativní. Kmen *B. stabilis* ST480 na základě informací z webových stránek databáze MLST se zatím vyskytoval pouze u pacientů bez CF a v literatuře jsme nenašli, jestli by byl schopen se šířit mezi pacienty s CF. Ale včasnou diagnózou infekce a aplikací izolačního systému k potenciálnímu šíření infekce mezi další pacienty nedošlo. Jak jsme uvedli v Teoretické části této práce, zatím musíme na každý kmen pohlížet jako na potenciálně přenosný, o přenosnosti určitého kmene víme jen díky zkušenostem z jiných CCF, případně z odborné literatury.

Vyšší citlivost PCR má i svoji nevýhodu, tím je vyšší riziko falešně pozitivního nálezu. Toho jsme se obávali, a proto jsme pacienty, kteří měli svoji infekci Bcc diagnostikovanou pouze pomocí PCR, izolovali v rámci izolačního systému do samostatné skupiny - infekce Bcc diagnostikována pouze PCR. Tímto způsobem jsme se tak chtěli vyhnout případům, kdy pozitivita Bcc by byla určena jako falešně pozitivní způsobená laboratorní kontaminací a vystavili tak pacienta kontaktu s infikovanými pacienty a zisku infekce Bcc.

Analýzou našich výsledků jsme zjistili, že v našem centru jsme se setkali s výskytem transientní infekce (Tabulka č. 4). Od roku 1994 jsme transientní infekce zaznamenali u 15 % pacientů, u kterých byla stanovena infekce Bcc. Infekce Bcc přetrvávala u pacientů od 2,5 do 37 měsíců. Mezi nejčastější druhy, které způsobovaly transientní infekce, patřily *B. stabilis* (5 pacientů) a *B. contaminans* (4 pacienti) Tabulka č. 4. Nezaznamenali jsme žádný případ transientní infekce způsobené epidemickým kmenem *B. cenocepacia* ST32.

Faktor, který by mohl přispět k vymizení infekce, by mohla být včasná antibiotická terapie. U 12 pacientů ze 14 s transientní infekcí byla podána kombinace tří antibiotik vůči Bcc po dobu tří měsíců od stanovení infekce. Ve skupině chronicky infikovaných pacientů (25 ze 39 pacientů diagnostikovaných 2001-2010) jsme dohledali srovnatelný léčebný režim u 16 z nich, u 8 jsme léčbu nedohledali a jeden pacient byl bez léčby. Vzhledem k malému počtu pacientů bez antibiotické léčby, nemůžeme odlišit trend od náhody a nemůžeme z těchto dat vyvodit žádný závěr. Naše vnitřní léčebné postupy doporučují včasnou antibiotickou intervenci, ačkoliv její terapeutický efekt je diskutabilní.

Provedení této studie bylo pro naše CCF velice důležité. Bylo totiž nutné zhodnotit význam nested PCR, tak abychom se přesvědčili, že naše diagnostika tvoří pevný základ pro surveillance systém, který jsme se chystali vylepšit o genotypizační metody a specifickou detekci epidemického kmene *B. cenocepacia* ST32, viz následující kapitola.

3. SURVEILLANCE INFEKČÍ BAKTERIÍ KOMPLEXU *BURKHOLDERIA CEPACIA* VE FAKULTNÍ NEMOCNICI V MOTOLE

Cíl: Zavést 1) vhodný systém surveillance infekcí způsobené Bcc pomocí genotypizačních metod, 2) jednoduchou PCR, která by specificky diagnostikovala infekci způsobenou epidemickým kmenem ST32.

Důvod: Systém surveillance umožňuje monitorovat epidemiologickou situaci.

Autorská publikace k tématu: Publikace č. 1, 3

Následující kapitola je rozdělena do čtyř částí. V první z nich se věnujeme hledání vhodných genotypizačních metod, které by se staly součástí systému surveillance. Druhá část je věnována genomické subtraktivní hybridizaci, pomocí které jsme blíže charakterizovali epidemický kmen *B. cenocepacia* ST32, a pomocí které jsme vytipovali sekvence, které se staly potenciálními cíli pro navržení primerů pro specifickou PCR. V této části se podrobně věnujeme principu a provedení genomické subtraktivní hybridizace, protože se domníváme, že tato ne tak častá metoda zaslouží větší prostor k vysvětlení. Třetí část se věnuje optimalizaci podmínek a testování specifity a citlivosti PCR specificky navržené k diagnostice infekce způsobené *B. cenocepacia* ST32. V závěrečné části popisujeme dva podsystémy surveillance systému infekcí Bcc u chronicky infikovaných pacientů a pacientů, u kterých byla jejich infekce diagnostikována poprvé.

3.1. Genotypizační metody u Bcc

Pro typizaci Bcc již byla využita řada genotypizačních metod. Jedna z prvních metod byla ribotypizace (110, 111). Samozřejmě byl mnohokrát použit zlatý standard genotypizace - PFGE (112, 113), také RAPD (114), AFLP (115) a další. Pracovní skupina pro bakterie komplexu *Burkholderia cepacia* doporučila MLST jako zlatý standard typizace pro Bcc.

Každá laboratoř zabývající se typizací Bcc má svůj vlastní systém typizace. Záleží vždy na finančních možnostech a možnostech přístrojového vybavení laboratoře, může-li si dovolit provádět metodu MLST jako metodu první volby. Naším cílem bylo navrhnout co nejlepší systém vyšetření Bcc až na úroveň kmene, aniž bychom finančně zatížili chod laboratoře a

zároveň jsme nechtěli, abychom negativním způsobem ovlivnili servis poskytovaný našim klinickým pracovníkům, potažmo pacientům.

Zaměřili jsme se na metody genotypizace, na které byla LMG Pediatrické kliniky a ÚLM vybavena. Prováděli jsme optimalizaci a testování tří metod, které se mohly využít v systému surveillance. Jednalo se o PFGE, RAPD a MLST.

Typizace pomocí PFGE a RAPD se provádí pouze z čisté bakteriální kultury, což znamená, že jsme v těchto případech závislí na tom, zda se podaří izolovat Bcc pomocí kultivačních médií. Jak už jsme zmínili v Obecné části, identifikace Bcc pomocí klasické kultivace je obtížná, citlivější metoda identifikace je PCR. Několikrát jsme čelili problému, jak určit kmenovou příslušnost v případech, kdy PCR vykazovala pozitivitu Bcc v klinickém materiálu a kultivace nám neposkytla kulturu Bcc z daného materiálu. Řešením by bylo zavedení metody, která by byla schopna identifikovat kmen přímo z klinického materiálu v době, kdy kultivace pozitivitu nevykazuje z důvodu nízké kvantity, tedy pomocí nested PCR amplifikace a sekvenace MLST. V ostatních případech by postačila metoda, která by byla založena na porovnání fingerprintového profilu. Mezi tyto metody patří RAPD a PFGE. RAPD metoda je považována za nedostatečně reprodukcibilní, důvodem je problematická separace amplifikovaných fragmentů klasickou horizontální elektroforézou, nicméně s rozvojem elektroforézy na čipu svítala naděje, že by se reprodukcibilita mohla zlepšit. Základem testování RAPD v naší studii bylo provedení mezilaboratorní studie reproducibility. PFGE je metoda časově náročná a již dříve jsme se přesvědčili, že v případě genotypizace Bcc trpí variabilitou mezi jednotlivými izoláty téhož druhu (55). Nicméně i tak jsme ji použili, abychom mohli porovnat, zda se neosvědčí a nebude mít lepší reprodukcibilitu než RAPD.

3.1.1. Metodika genotypizačních metod

Multilokusová sekvenční typizace (MLST)

Protokol MLST, ze kterého jsme vycházeli pro účely zavedení typizace nejen z bakteriální kultury, ale i kvůli schématu nested PCR pro typizaci přímo z klinického materiálu, je navržen také pro účely typizace z bakteriální kultury (20). K zavedení nested PCR pro účely MLST jsme použili kombinaci primerů ze dvou literárních zdrojů (20, 116). Izolace DNA pro MLST z čisté bakteriální kultury se provedla pomocí chelexu (Chelex 100 Resin, BioRad). Pro nested schéma MLST z klinického materiálu se DNA vyizolovala pomocí kitu Amplicor Respiratory Specimen Extraction kit (Roche).

Nested PCR pro MLST je složeno z PCR amplifikace 1 a 2, následuje přečištění PCR produktů pomocí Agentcourt Ampure (Beckman Coulter) robotem Biomek (Beckman Coulter), aby se odstranily složky z PCR mixu, zejména nenavázané nukleotidy. Poté je provedena sekvenační reakce, přečištění sekvenační reakce Agentcourt CleanSeq (Beckman Coulter) robotem a sekvenace na sekvenátoru abi3130xl (Applied Biosystems). U MLST z bakteriální kultury je složené ze stejných kroků jako nested schéma, ale bez PCR amplifikace 2.

Protokol pro PCR amplifikaci 1: celkový objem reakce 20 μ l, který obsahoval 2,0mM $MgCl_2$, 0,2mM dNTPs každý, 0,625 μ M amplifikační primer každý, 1x Q-solution, 0,75 U *Taq* polymeráza (Qiagen), 1 μ l DNA.

Amplifikační program PCR amplifikace 1: počáteční denaturace 96°C, 5 minut, následuje 30 cyklů složených z denaturace 96°C, 30 s; nasednutí primerů 55°C, 30 s; syntézy 72°C, 2 minuty.

Protokol pro PCR amplifikaci 2: složení PCR reakce je stejné jako v případě amplifikace 1, s výjimkou amplifikačních primerů a jako DNA templát se použije 1 μ l z amplifikace 1.

Amplifikační program PCR amplifikace 2: počáteční amplifikace 95°C, 10 min, 10 cyklů složených z denaturace 96°C, 15 s; nasednutí primerů 60°C, 30 s; syntézy 72°C, 45 s; 30 cyklů složených z denaturace 96°C, 15 s; nasednutí primerů 55°C, 30 s; syntézy 72°C, 45 s; závěrečná syntéza 72°C, 10 min.

Sekvenační reakce se prováděla pomocí kitu BigDye Terminator v3.1 (Life Technologies) v celkovém reakčním objemu 10 μ l s jedním ze sekvenačních primerů o koncentraci 0,625 μ M, 1x sekvenační pufr, sekvenační směs BigDye Terminator a 2 μ l přečištěného PCR produktu. Sekvenační program byl složen z počáteční denaturace 96°C, 1 min; 25 cyklů složených z denaturace 96°C, 10 s; nasednutí primerů 55°C, 5 s; syntéza 60°C, 4 min a závěrečné syntézy 72°C, 7 min.

Získané sekvence se analyzovaly pomocí PreGap4 a Gap4 programů (Staden Package).

Náhodná amplifikace polymorfních úseků DNA (RAPD)

Studii mezilaboratorní reproducibility RAPD jsme prováděli na dvou pracovištích: v laboratořích Přírodovědecké fakulty Univerzity v Cardiffu a 2. lékařské fakulty, Univerzity Karlovy v Praze. Otestovali jsme celkem 65 Bcc izolátů a 2 izoláty *Pseudomonas* spp. Sbírka obsahovala 38 klinických izolátů od pacientů s CF, 22 enviromentálních izolátů, 5 klinických izolátů od pacientů, kteří neměli CF a 2 izoláty jiného druhu *Pseudomonas fluorescens* a *P. putida*. Všechny izoláty pocházely z Cardiffské sbírky referenčních kmenů, každý izolát byl definován svým druhem, taxonomickou skupinou či ST typem.

Protokol vycházel z publikovaného postupu (114), který byl upraven v krocích extrakce DNA a separaci RAPD produktů. Nově se DNA extrahovala z jedné kolonie pomocí chelexu (Chelex 100 Resin, BioRad) podle doporučeného postupu výrobce a k separaci RAPD produktů jsme použili elektroforézu na čipu Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent). Na obou pracovištích se pracovalo standardizovaným způsobem pro kroky extrakce DNA, použitých PCR chemikálií (Qiagen), PCR amplifikačního cyklu (ne však termální cykler) a elektroforetické separace. K amplifikaci se použily primery **RAPD270** (5'-TGCGCGCGGG-3'); **RAPD272** (5'-AGCGGGCCAA-3'). S každým amplifikačním během se vždy použila interní kontrola, každý běh byl tvořen 12 vzorky (interní kontrola a 11 referenčních kmenů). Referenční kmen Bcc0001 *B. cepacia* ST10 sloužil jako interní kontrola.

Reakční mix o objemu 25 µl složený z chemikálií *Taq* PCR Core kit (Qiagen) obsahoval: 1x PCR pufr, 1x Q roztok, 1,5mM MgCl₂, 0,2mM dNTP každý, 160 nM primer 270 / 272, 1U *Taq* polymerázy a 2 µl DNA. PCR program, který probíhal v termocykleru Labcykler SensoQuest (Schoeller Instruments) byl složen z počáteční denaturace 94°C, 5 min, následovaly 4 cykly nasednutí primerů 36°C, 5 min; syntéza 72°C, 5 min; denaturace při 94°C 5 min; 30 cyklů složených z denaturace 94°C, 1 min s ramping časem 0,9°C/sec; nasednutí primerů 36°C, 1 min s ramping časem 1,7°C/sec; syntézy 72°C, 2 min s ramping časem 1,3°C/sec a závěrečná syntéza při 72°C, 10 min.

Elektroforetická separace se prováděla bezprostředně po proběhlé amplifikaci nebo následující den podle instrukcí výrobce elektroforézy Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent) s kity separující fragmenty dlouhé od 100 do 7 500 bp Agilent DNA 7500 (Agilent). RAPD profily vytvořené v obou laboratořích se porovnávaly pomocí GelCompare II (Applied Maths).

Makrorestrikční analýza v pulzním poli (PFGE)

Příprava makrorestrikční analýzy se provádí z čisté bakteriální kultury. K vlastnímu experimentu jsme použili kmen z Cardiffské referenční sbírky izolátů: **Bcc0665** *B. cenocepacia* ST28 a klinické izoláty *B. cenocepacia* ST32.

Plugy určené ke štěpení restrikčním enzymem se připravují z živých, přes noc narostlých bakteriálních buněk na TSA (trypton soya agar). Čistou jednorázovou bakteriologickou kličkou se setře narostlá kultura a přenesse se do 500 µl SE pufru. Pomocí pipety s 200 µl špičkou se opakovaným nasáváním suspenze resuspenduje dokud není homogenní. Homogenizovaná kultura se centrifuguje 5 min, 4 000 rpm. Supernatant se slije do odpadní nádoby a opět se přidá 500 µl SE pufru, vše se opakuje 3 krát. Během promývání je čas na

přípravu 2% agarózy na PFGE plugy. Připraví se z 0,2 g Plug Mold agarózy (Sigma Aldrich) a 10 ml SE pufru. Zváží se na vahách a povaří v mikrovlnné troubě do té doby, než bude veškerá agaróza rozpuštěná. Zkontroluje se hmotnost a doplní se odpařený SE pufr, aby se koncentrace agarózy nezvýšila. Hotová agaróza se uchovává ve vodní lázni při teplotě 45 – 50°C. Při posledním promytí SE pufrem se přidá opět 500 µl SE pufru, resuspenduje se a poté se bakteriální kultura adjustuje pomocí spektrofotometru při nastavení optické hustoty (OD) 600 nm na OD 0,8-0,9. Jako blank se použije SE pufr. Dvě stě mikrolitrů adjustované kultury se použije k dokončení plugů. Naředěné kultury se předehejí ve vodní lázni. Do každé nahřáté bakteriální kultury se přidá 200 µl 2% agarózy. Bakteriální kulturu s agarózou se promíchá, aby směs byla homogenní a přepipetuje se do formiček na plugy. Plugy se nechají zchladnout v lednici přibližně 10 minut. Poté se z formiček plugy přenesou do 15 ml uzavíratelných zkumavek, které obsahují 5 ml PEN roztoku a 250 µl Pronázy. Bakteriální buňky v pluzích se lyzují přes noc při 37°C. Druhý den se lyzované buňky promyjí v 5 ml PEN pufru. Promývají se při 37°C, 20 minut, celkem 3 krát. Restrikční mix ke štěpení s enzymem *SpeI* obsahuje na 1 plug: *SpeI* (10U) 0,3 µl, restrikční pufr 15 µl, BSA (bovine serum albumin) 1,5 µl a injekční voda 113,2 µl; celkový objem na 1 plug činí 130 µl. Z plugů se sterilním sklíčkem odřízne úzký proužek a vloží se do mixu. Restrikční štěpení probíhá nejméně 4 hodiny při 37°C. Agaróza k vlastní PFGE se připraví z 1,2 g PF Certificated BioRad agarózy (BioRad) a 100 ml TBE pufru (Tris-borát-EDTA), povaří se v mikrovlnné troubě a doplní se odpařený objem. Agaróza se nechá vytemperovat na teplotu 45 – 50°C. Po ukončení reakce se plugy narovnají na hřeben, hřeben se založí do formy a přidá se připravená agaróza, přičemž přibližně 1,5 ml agarózy se ponechá na zaplnění jamek. Gel zcela ztuhne po 30 minutách, zbylá agaróza se použije k zaplnění jamek po hřebenu. Před elektroforézou se gel z formy vyndá a vloží do elektroforetického tanku a spustí se elektroforéza. Program pro separaci Bcc: 1. blok switch time: 1 – 40 sec, 10 hodin, nastavením voltů 6 V/cm; 2. blok switch time 30 – 90 sec, 14 hodin, nastavení voltů 6V/cm. Po 24 hodinách pulzní elektroforézy se gel barví pomocí ethidium bromidu (EtBr): 40 µl EtBr a 200 ml 1x TBE pufru, barví se 30 minut.

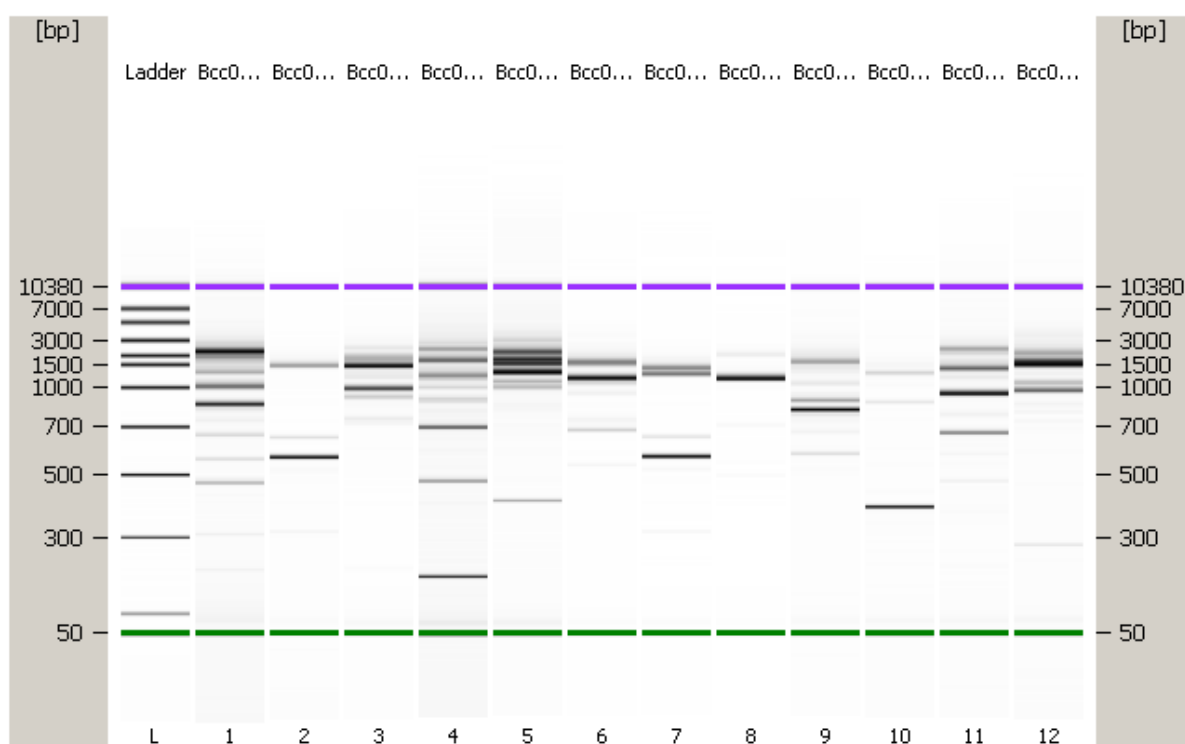
3.1.2. Výsledky – výběr vhodných genotypizačních metod

V LMG Pediatrické kliniky a ÚLM se podařilo zavést metodu MLST, navíc jsme tuto metodu modifikovali a vytvořili nested schéma pro identifikaci kmene přímo z klinického materiálu. Hlavní modifikace spočívala v kombinaci primerů. Vytvořili jsme systém primerů pro 1., 2. kolo a sekvenační reakci. Schéma č. 2 představuje kombinaci primerů používaných pro typizaci Bcc z bakteriální kultury a klinického materiálu, zároveň toto schéma představuje umístění primerů v 96 poziční destičce. Primery jsou naředěny na požadovanou koncentraci. Ačkoliv se většina primerů z jednotlivých kroků shoduje, toto rozložení usnadňuje práci laborantovi. Lze totiž pro kterýkoliv typ vyšetření pracovat s celým sloupcem desky najednou. Například při vyšetření z klinického materiálu se pro první kolo používají primery z 1. a 2. sloupce, pro druhé kolo jsou určeny primery ze 3. a 4. sloupce, pro sekvenační reakci primery z 5. a 6. sloupce. V případě vyšetření bakteriální kultury nám postačí provedení pouze 1. kola a sekvenační reakce, tomu odpovídají primery ze 7. a 8. sloupce. Poslední čtyři sloupce desky jsou určeny k MLST pro *Pseudomonas aeruginosa*. V LMG Pediatrické kliniky a ÚLM typizujeme pomocí MLST i PA.

Číslo, které se nachází před názvem primeru (1, 2, 3) v jednotlivých pozicích desky značí literární zdroj, ze kterého jsme při modifikaci vycházeli. Tedy v případech označení primerů např. 1atpD jsme vycházeli z publikace od A. Baldwina et al. (20), primery byly původně navrženy pro 1. kolo PCR MLST, označení 2atpD vychází ze stejné publikace, primery byly určeny pro sekvenační reakci, číslo 3 jsou primery navrženy T. Spilkerem et al. (116).

Provedením mezilaboratorní studie reproducibility metody RAPD, nově s využitím extrakce DNA pomocí chelexu a nové mikrofluidní elektroforézy na čipu, jsme zjistili, že se výrazně zlepšila její mezilaboratorní reproducibilita. Reproducibilita interní kontroly Bcc0001 dosahovala mezi oběma pracovišti 87 % při použití primeru 270 a 99,3 % s primerem 272. Navíc jsme mezi oběma pracovišti dosáhli u 62 z 65 testovaných izolátů Bcc reproducibility vyšší než 97 % s použitím primeru 270. V porovnání s MLST byla metoda RAPD schopna správně odlišit 41 z 59 (69,5 %) ST typů, naopak nebyla schopna spolehlivě odlišit izoláty v rámci klonálních komplexů jako například v případě ST typů *B. cenocepacia* ET12 linie. Porovnáním v GelCompareII nebyly jednotlivě odděleny, ale vytvářely spolu jeden klastr. Na základě provedené studie jsme potvrdili velice dobrou mezilaboratorní stabilitu. Vezmeme-li v úvahu, že tato metoda je v porovnání s jinými genotypizačními metodami (MLST, PFGE) rychlá, snadná a méně finančně náročná, lze ji v praxi využít k

prvoscreeningové identifikaci kmenů Bcc. Separace RAPD fragmentů pomocí elektroforézy na čipu Bioanalyser 2100 Agilent je znázorněna na Obrázku č. 2.



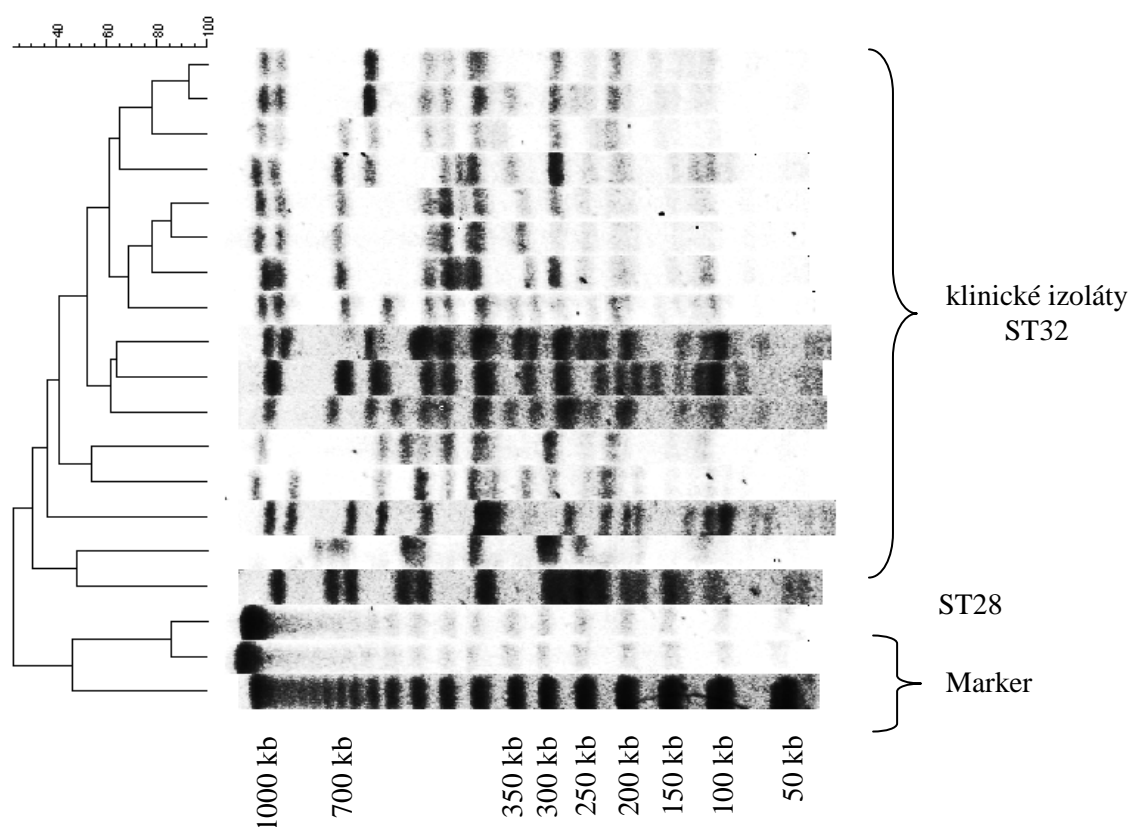
Obrázek č. 2 Ukázka separace RAPD fragmentů pomocí elektroforézy Bioanalyseru 2100 Agilent. Gel obsahuje 12 vzorků a marker (sloupec L).

Každý sloupeček 1 až 12 (Obrázek č. 2) představuje jeden vzorek, kde fragmenty o délce 50 bp (zelená barva) a 10 380 bp (fialová barva) představují vnitřní markery, které jsou součástí komerčně dodávaného kitu a přidávají se na čip společně se vzorkem. Tato podoba gelu se převede do elektronické podoby a zpracovává se pomocí softwaru BioNumerics (Applied Maths), kde se vnitřní markery používají k normalizaci gelu a porovnání jednotlivých profilů navzájem z různých RAPD běhů. Pomocí tohoto softwaru lze provádět clusterovou (shlukovou) analýzu mezi vzorky a určit mezi nimi míru podobnosti. Příklady výsledků clusterových analýz můžete vidět na Obrázku č. 3 a 4 na následujících stránkách této části kapitoly, které byly připraveny právě tímto softwarem.

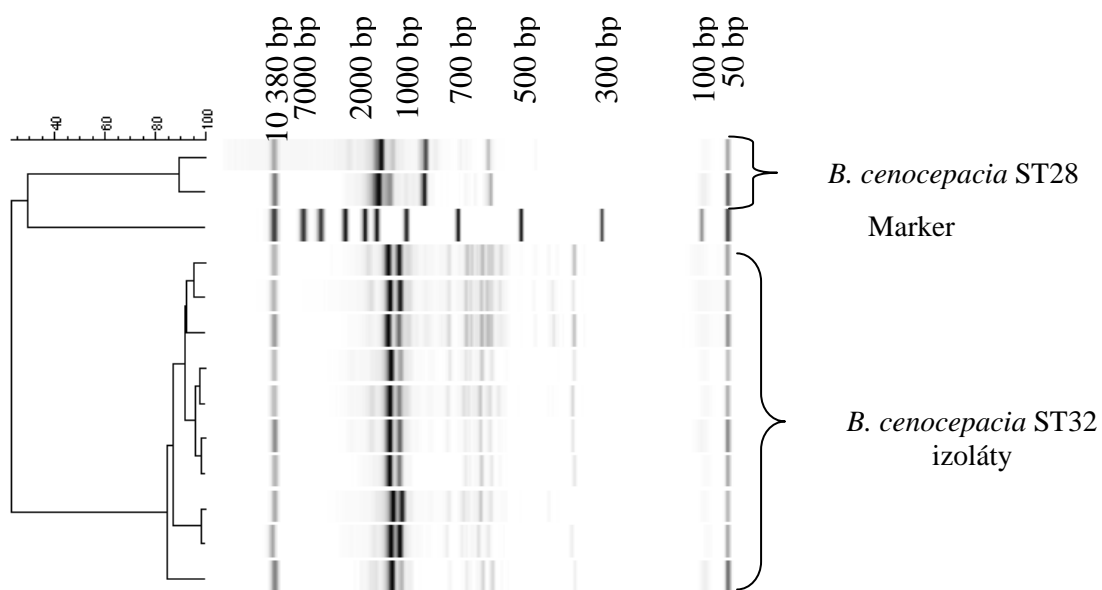
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.
	1.kolo materiál	1.kolo materiál	2.kolo materiál	2.kolo materiál	SR materiál	SR materiál	1.kolo, SR kultura	1.kolo, SR kultura				
A:	3atpD5	1atpD3	3atpD5	3atpD3	3atpD5	3atpD3	3atpD5	3atpD3		MLST schéma pro <i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
B:	1gltB5	1gltB3	3gltB5	3gltB3	3gltB5	3gltB3	3gltB5	3gltB3				
C:	3gyrB5	1gyrB3	3gyrB5	3gyrB3	3gyrB5	3gyrB3	3gyrB5	3gyrB3				
D:	3recA5	1recA3	3recA5	3recA3	3recA5	3recA3	3recA5	3recA3				
E:	1lepA5	1lepA3	3lepA5	3lepA3	3lepA5	3lepA3	3lepA5	3lepA3				
F:	1phac5	1phaC3	3phaC5	3phaC3	3phaC5	3phaC3	3phaC5	3phaC3				
G:	1trpB5	3trpB3	3trpB5	1trpB3	2trpB5	2trpB3	3trpB5	3trpB3				
H:												

Schéma č. 2. Rozvržení a kombinace primerů pro jednotlivé kroky nested MLST k typizaci Bcc z klinického materiálu a bakteriální kultury. MLST schéma pro *Pseudomonas aeruginosa* představuje rozvržení a kombinaci primerů pro MLST *Pseudomonas aeruginosa*. SR sekvenační reakce.

Obrázek č. 3 zobrazuje výsledek PFGE 15 izolátů *B. cenocepacia* ST32 a referenčního kmene *B. cenocepacia* ST28 (Bcc0665). Jedná se analýzu dvou samostatných PFGE. Obrázek je připraven clusterovou analýzou pomocí softwaru BioNumerics (Applied Maths). Fotografie se převrátí do bíločerného provedení, každý izolát se rozdělí do jednotlivých linií a označí se vytvořené fragmenty DNA. Dva ze tří markerů mají vzájemnou podobnost 80 %, markery byly připravené stejnou PFGE, třetí marker dosahuje podobnosti k předchozím markerům jen z 50 %. Což ukazuje, že se výsledky mezi jednotlivými PFGE mohou lišit. Na základě makrorestrikční analýzy v pulzním poli několika izolátů *B. cenocepacia* ST32 a kmene ST28, který je úzce příbuzný k ST32 je pozorovatelná vyšší variabilita v porovnání s metodou RAPD. Na Obrázku č. 4 je znázorněna clusterová analýza profilů RAPD 10 klinických izolátů *B. cenocepacia* ST32 připravených v různých časových intervalech. Všechny profily dosahují podobnosti vyšší než 80 % a i pouhým okem je pozorovatelná shoda jednotlivých fingerprintových profilů oproti profilům vytvořeným pomocí PFGE. Metoda RAPD je v tomto případě více reprodučibilní a vytváří jednoznačnější fingerprintový profil než PFGE.



Obrázek č. 3 Porovnání dvou samostatných PFGE kmenů *B. cenocepacia* ST32 (klinické izoláty) a ST28 (referenční kmen Bcc0665).



Obrázek č. 4 Clusterová analýza RAPD profilů kmenů *B. cenocepacia* ST32 (10 klinických izolátů od 10 pacientů s ST32 infekcí) a ST28 (referenční kmeny Bcc0665 a Bcc0313) provedených v různých časových intervalech.

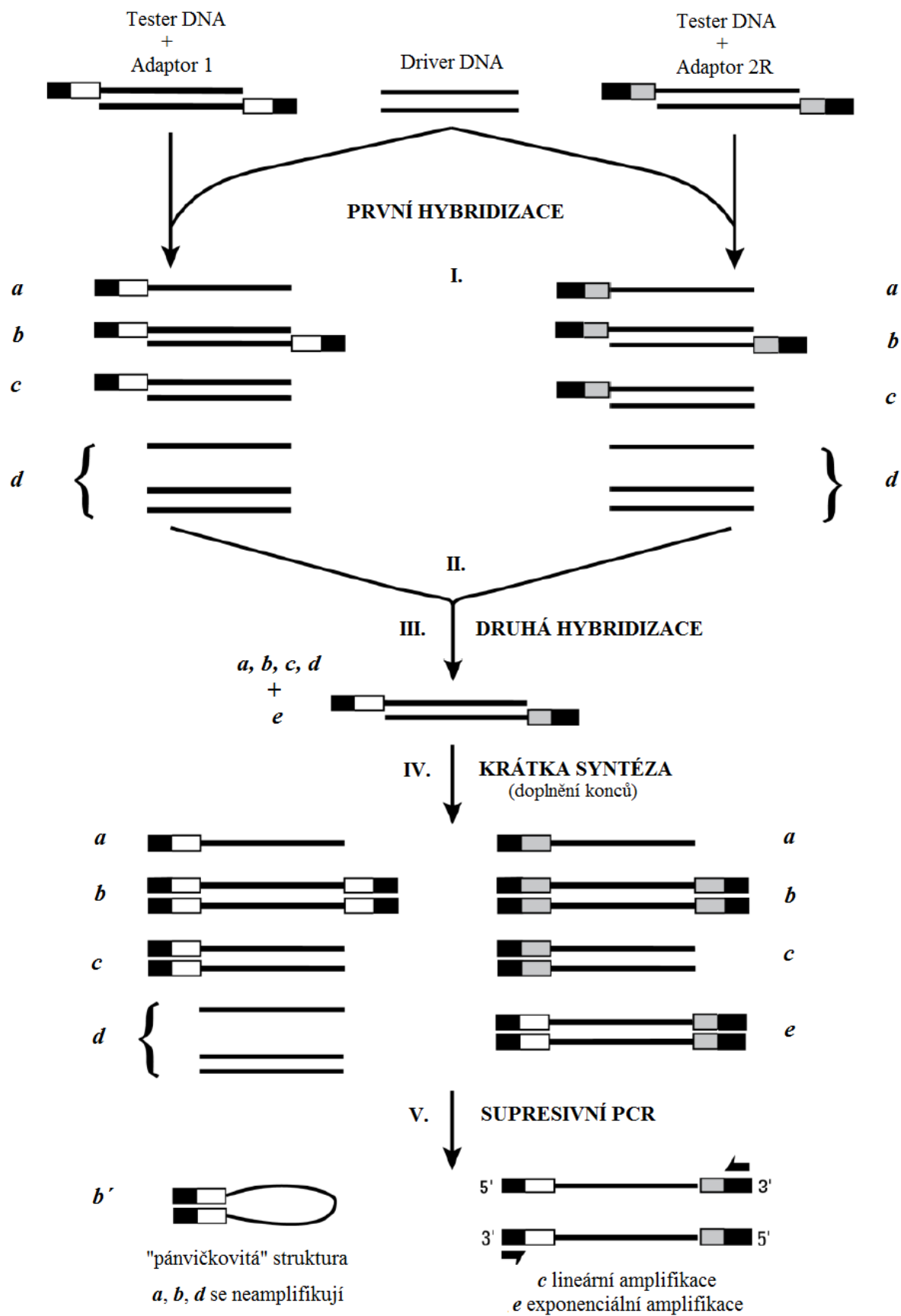
Na základě této studie jsme vybrali metody MLST a RAPD, které se budou využívat ke genotypizaci Bcc v LMG Pediatrické kliniky a ÚLM.

3.2. Genomická subtraktivní hybridizace

Genomická subtraktivní hybridizace (GSH) je metoda používaná zejména k tvorbě genových knihoven. Slouží k porovnání dvou genomů, přičemž v jednom genomu hledáme geny či sekvence, které se nevyskytují v genomu druhém tzv. referenčním. Vzorek genomické DNA, ve kterém hledáme specifické geny, se nazývá tester DNA, referenční DNA označujeme driver. Princip subtraktivní hybridizace lze aplikovat v různých obměnách pro eukaryotické i prokaryotické genomy. GSH se používá k nalezení kmenově specifických genů (117) například genů virulence (118), genů spojených s antibiotickou rezistencí či povrchovou strukturou bakterií (119). Subtraktivní cDNA (komplementární DNA) hybridizace se využívá k identifikaci genů spojených s určitými chorobami, k hledání produktů genů s rozdílnou mírou exprese (120). Naším cílem bylo kromě bližší molekulární charakteristiky kmene ST32 nalézt v genomu DNA oblast, která by byla unikátní pro kmen ST32. Tato oblast by se stala vhodným cílem pro navržení specifické PCR, pomocí které bychom diagnostikovali infekci způsobené tímto kmenem bez nutnosti časově a finančně náročných technik genotypizace.

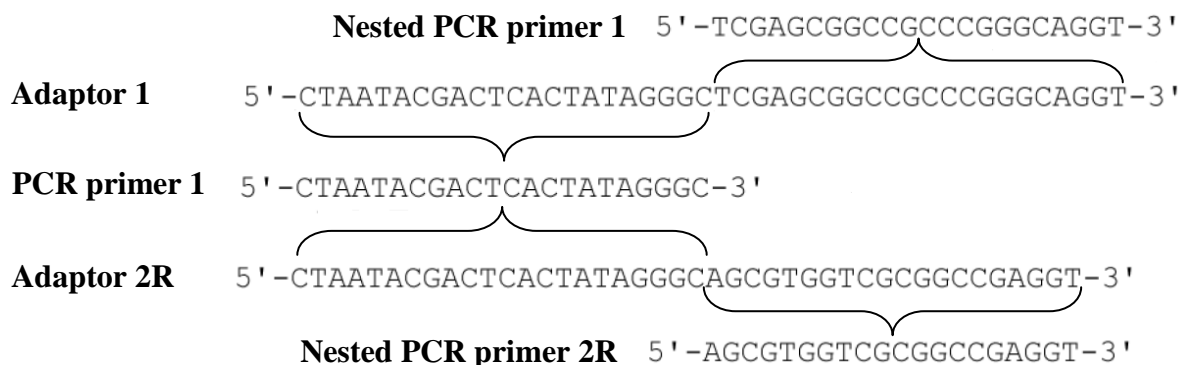
3.2.1. Princip GSH

Obě genomické DNA se naštěpí restrikcí enzymem, který vytvoří DNA fragmenty s tupými konci. Tester DNA se rozdělí na dvě části a každá z nich je ligována s jiným adaptorem. Konce adaptorů nejsou fosforylovány, dochází tedy k připojení adaptorů k tester DNA pouze na 5' koncích. Po ligaci následuje první hybridizace (Obrázek č. 5 (I.)), ke každé směsi tester DNA s navázanými adaptory se přidá nadbytek driver DNA. Vzorky se nejdříve zdenaturují, poté hybridizují, čímž dochází k vytvoření molekul typu **a** (volná vlákna tester DNA), **b** (spojená vlákna tester DNA), **c** (spojené vlákno tester a driver DNA) a **d** (volná či spojená vlákna driver DNA). Molekuly typu **a** jsou tester-specifické sekvence, zatímco molekuly typu **c** nejsou specifické pro tester DNA, a proto hybridizují s driver DNA. Před druhou hybridizací se bez denaturace smísí obě reakční směsi z první hybridizace (II.) a přidá se nadbytek denaturované driver DNA. Druhá hybridizace (III.) zajistí, že jednořetězcové tester DNA vytvoří nový typ molekul **e**, tvořené ze dvou řetězců DNA s oběma typy adaptorů na 5' koncích. Krátká syntéza (IV.) před supresivní PCR doplní konce hybridizovaných molekul.



Obrázek č. 5 Provedení genomické subtraktivní hybridizace. Obrázek převzat a upraven z návodu ke kitu PCR Select Bacterial Genome Subtraction kit (Clontech).

V prvním kole - supresivní PCR (V.) - nejsou amplifikovány molekuly, které nemají navázány adaptory *a* a *d*. Adaptory mají totiž identickou sekvenci 22 nukleotidů, na kterou nasedá primer (PCR primer 1, Obrázek č. 6) pro supresivní PCR, druhá část je rozdílná, zde nasedají primery pro druhé kolo PCR (Nested PCR primer 1 a 2R, Obrázek č.6).



Obrázek č. 6 Sekvence adaptorů 1 a 2R s odpovídající primery. Obrázek převzat a upraven z návodu ke kitu PCR Select Bacterial Genome Subtraction kit (Clontech).

Díky supresivnímu efektu PCR nedochází k amplifikaci ani molekul *b* z druhé hybridizace. K supresivnímu efektu dochází díky přítomné komplementární sekvenci na obou koncích jednořetězcové molekuly. Během každého kroku nasednutí primerů na komplementární oblast adaptorů, hybridizační kinetika upřednostňuje tvorbu „pánvičkovité“ sekundární struktury (*b*'), která brání nasednutí primerů. Během této PCR se účinně potlačuje tvorba nespecifické amplifikace a naopak specificky exponenciálně se amplifikují molekuly DNA (*e*) s různými adaptory na obou koncích. Ačkoliv adaptory navázané na molekulách *e* obsahují krátkou komplementární oblast na svých koncích, celkově tato krátká homologní oblast účinně ruší supresivní účinek PCR s výjimkou velmi krátkých sekvencí. Druhá PCR redukuje pozadí PCR produktů a obohacuje směs o tester-specifické oblasti.

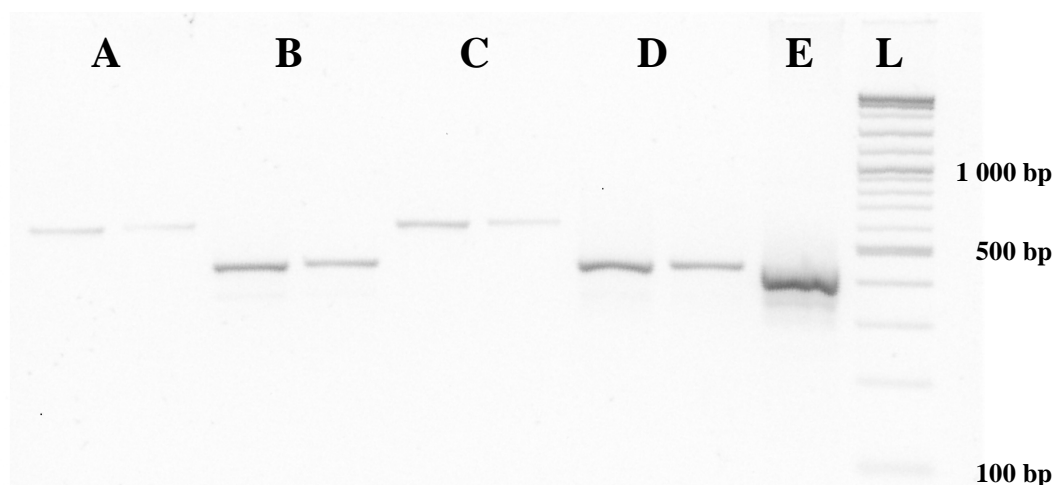
Tester-specifické fragmenty DNA se vklouňují do T/A klonujícího vektoru a vytvoří se subtraktivní DNA knihovna. Pomocí Southern blot analýzy lze potvrdit distribuci DNA fragmentů z jednotlivých klonů v tester a driver DNA. Klony, které hybridizují pouze s tester sondou a ne s driver jsou tester-specifické DNA fragmenty. Hybridizují-li s oběma sondami jedná se o pozadí. Správné provedení jednotlivých kroků GSH lze kontrolovat pomocí kontrolních analýz, které se aplikují jak na vlastní vzorky, tak na kontrolní DNA, která je součástí komerčně dodávaného kitu.

Princip kontrolních analýz

Úplné naštěpení genomické tester a driver DNA se kontroluje pomocí nízkoprocentní agarózové gelové elektroforézy, která probíhá při nízkém napětí přes noc. DNA, která není naštěpená restrikčním enzymem se na gelu zobrazí jako proužek o vysoké molekulové hmotnosti, zatímco naštěpená DNA se zobrazí jako smear od 100 do 2 000 bp.

Kontrola ligace adaptorů je založena na PCR. Současně ještě dojde k ověření, zda byla DNA dostatečně naštěpená. Princip této kontroly je založen na specifické amplifikaci známého genu testované DNA, který v amplifikované oblasti neobsahuje restrikční místo, ale obsahuje jej mimo ni. Provedou se dvě oddělené PCR, kde se v jedné reakci amplifikují produkty pomocí specifických primerů pro daný gen. Druhá reakce obsahuje primer specifický pro cílový gen a druhý primer nasedající na oblast ligovaných adaptorů. Liší-li se intenzita těchto PCR produktů na gelu po proběhlé elektroforéze čtyřnásobně, ligace proběhla nedostatečně a je potřeba ligaci zopakovat. Zobrazí-li se na gelu dva různé produkty v případě, kdy se PCR produkt amplifikoval s primerem pro adaptorovou oblast, znamená to, že testovaná DNA byla nedostatečně naštěpena. Restrikční štěpení je potřeba opakovat zejména, převládá-li významně delší produkt. V případě testované DNA (*B. cenocepacia* ST32) jsme použili primery pro gen *recA* (2recA5 a 2recA3), amplifikací vzniká produkt o délce 440 bp (Obrázek č. 7 B, D), štepné místo v oblasti tohoto genu se nachází o 100 bp dále, PCR produkt amplifikovaný primerem 2recA5 a P1 pro oblast adaptoru má délku 540 bp (Obrázek č. 7 A, C), v případě nedostatečně naštěpené DNA se amplifikuje produkt o délce 800 bp.

Kontrola supresivní PCR reakce se provádí pomocí agarózové gelové elektroforézy. Předpokládaným správným výsledkem amplifikovaných produktů po GSH by měl být smear od 200 do 2 000 bp s několika znatelnými bandy.



Obrázek č. 7 Očekávaný výsledek kontroly ligace pro *B. cenocepacia* ST32. Pozice A, C: primery 2recA5 a primer P1 nasedající k adaptoru, délka produktu 540 bp, popř. 800 bp. Pozice B, D: primery pro *recA* gen, délka produktu 440 bp; E: primery pro *recA* gen (440 bp), neštěpená genomická DNA *B. cenocepacia* ST32; L žebříček.

3.2.2. Metodika GSH

V naší studii jsme porovnávali český epidemický kmen ST32 s kmenem jemu úzce příbuzným *B. cenocepacia* ST28 (LMG16656, J2315), jehož genom je osekvenován a publikován (121). Tyto kmeny se na základě konkaténovaných sekvencí 7 housekeepingových genů v rámci MLST liší ve 3 genech 12 nukleotidy.

GSH jsme provedli pomocí komerčně dodávaného kitu PCR Select Bacterial Genome Subtraction kit (Clontech) podle návodu dodávaného výrobcem. Prováděli jsme i kontrolní analýzy jednotlivých kroků, které doporučuje výrobce provést.

Tester a driver DNA

DNA *B. cenocepacia* ST32 sloužila jako tester a DNA *B. cenocepacia* ST28 jako driver. Obě DNA referenčních kmenů LMG16656 (*B. cenocepacia* ST28) a CCM7291 (*B. cenocepacia* ST32) se extrahovaly vysolováním z bakteriální kultury narostlé přes noc.

Restrikční štěpení a ligace adaptorů

Dva µg DNA testeru a driveru se štěpily pomocí 15 U *RsaI* enzymu ve 200 µl mixu při teplotě 37°C po dobu 5 hodin. Analýza správně naštěpené DNA se ověřovala provedením 1%

agarózové gelové elektroforézy, 1 V/cm, 18 hodin. DNA testeru se rozdělila na dvě části a pomocí T4 DNA ligázy se k naštěpeným fragmentům připojily dva různé adaptory. Ligační mix o objemu 10 µl obsahoval 1x ligační pufr, 400 U T4 DNA ligázy a jeden z adaptorů o koncentraci 10 µM. Ligace probíhala přes noc při teplotě 16°C. Přidáním 1 µl 0,2M roztoku EDTA se ligace ukončila, vzorky se zahřály na teplotu 72°C, 5 minut. Jeden mikrolitr z každé ligační směsi se použil k následné kontrole ligace pomocí PCR.

Kontrola součástí kitu byla navržena pro *E. coli* - postupovali jsme podle doporučení výrobce. Pro účely testované DNA jsme použili vlastní PCR pomocí primerů 2recA5 a 2recA3. Reakční mix o objemu 20 µl obsahoval finální koncentrace reagensů *Taq* PCR Core kit (Qiagen): 1x PCR pufr, 3mM MgCl₂, 0,2mM dNTPs každý, 1x Q-solution, 0,5µM primery, 0,75 U HotStart *Taq* polymerázy, 1 µl ligační směsi naředěné ve sterilní vodě v poměru 1 : 200. Amplifikační program byl složen z počáteční aktivace HotStart *Taq* polymerázy 95°C, 15 min; 30 cyklů složených z denaturace při 94°C, 30 s; nasednutí primerů 60°C, 30s a syntézy 72°C, 90 s. Po PCR amplifikaci proběhla kontrola produktů gelovou elektroforézou.

Hybridizace

Po provedení kontrolní reakce následovala první hybridizace: hybridizační mix o objemu 4 µl obsahoval 1x hybridizační pufr, 1 µl DNA testeru navázané s jedním typem adaptoru a 2 µl naštěpené DNA driveru. Vzorky se nejdříve zdenaturovaly při 98°C, 1,5 min v termálním cykleru. Hybridizace probíhala při teplotě 73°C (118), 1,5 hod, bezprostředně poté následovala druhá hybridizace. Vzorky z první hybridizace se smísily bez denaturace a přidala se denaturovaná DNA driveru. Vzorky se pipetou promíchaly, krátce zcentrifugovaly, aby kapky směsi neuzůstávaly na stěnách mikrozkušavky. Druhá hybridizace probíhala přes noc při teplotě 73°C. Hybridizace se ukončila přidáním 200 µl dilučního pufru a inkubací 7 min při teplotě 73°C.

PCR

Pro obě kola PCR se použily PCR reagensie doporučené výrobcem Advantage 2 PCR kit (Clontech). Objem reakčního mixu byl 20 µl pro obě kola. Finální koncentrace reagensů pro první kolo: 1x PCR reakční pufr, 0,2mM dNTPs každý, 1x Advantage 2 polymerase mix, 0,5 µl hybridizované směsi. Amplifikační program začínal syntézou při teplotě 72°C, 2 min. Následovalo 25 cyklů složené z denaturace při teplotě 94°C, 30 s; nasednutí primerů 66°C, 30 s a syntézy při 72°C; 90 s. Reakční směs pro druhé kolo obsahovala: 1x SA PCR reakční pufr, 0,2mM dNTPs každý, 0,4mM nested primer 1, 0,4mM nested primer 2R, 1x 50x Advantage 2

polymerase mix, 1 µl PCR produktu z prvního kola naředěného 1 : 40. Amplifikační program byl složen z 15 cyklů denaturace při 94°C, 30 s; nasedání primerů při 68°C, 30 s a syntéza při 72°C, 90 s. Kontrola PCR pomocí 2% agarózové gelové elektroforézy v 1x TBE pufru, 6 V/cm, 50 min.

Klonování

Produkty z druhého kola se vklonovaly do pCR II-TOPO vektoru (Invitrogen). Molární poměr PCR produktů a vektoru byl 3 : 1. Ligoaná DNA byla transformována do chemicky kompetentních buněk *E. coli* One Shot Mach1-T1R. Transformované bakterie byly vyočkovány na LB agar obsahující ampicilin, isopropylthio-β-galaktosid a X-Gal (Invitrogen) kvůli modro-bílé selekci transformovaných buněk. Bílé kolonie se sterilní špičkou setřely z plotny, přenesly se do 150 µl LB média a nechaly se růst přes noc při teplotě 37°C, 200 rpm. Poté se kolonie zamrazily s 8% dimethylsulfoxidem. Inzerty byly amplifikovány pomocí 0,5µM M13 reverzního primeru a 0,5µM M13(-20) primeru forward (Invitrogen) v 15 µl reakčním mixu, který obsahoval: 1x PCR Gold pufr, 2,5mM MgCl₂, 0,2mM dNTPs a 0,5 U AmpliTaq Gold DNA polymerázy (AmpliTaq Gold kit). PCR reakce začala počáteční denaturací při teplotě 95°C, 10 min; následovalo 40 cyklů složených z denaturace při 95°C, 15 s; nasednutí primerů 55°C, 30s; syntéza 72°C, 90 s a finální syntéza při 72°C, 2 min. Délka inzertů byla zhodnocena pomocí 2% agarózové gelové elektroforézy.

Sekvenování

Amplifikované PCR produkty se přečistily pomocí magnetických kuliček MagneSil Paramagnetic Particles (Biomek 3000, Beckman Coulter). Po přečištění proběhla sekvenační reakce použitím BigDye Terminator v3.1 kit (Life Technologies) a sekvenačních primerů SP6 a T7 (Invitrogen). Pořadí nukleotidů jednotlivých inzertů byla stanovena pomocí automatického sekvenování (abi 3130xl, Applied Biosystems).

Tester specifické sekvence se zanalyzovaly pomocí BLASTN a BLASTX programů databází Národního centra pro biotechnologické informace (NCBI, National Center for Biotechnology Information) a databáze určené pro Bcc (BGD, Burkholderia genome database), které jsou volně dostupné na webových stránkách <http://www.burkholderia.com> (122).

3.2.3. Výsledky GSH

Po zaklonování DNA fragmentů z GSH do kompetentních buněk *E. coli* vyrostlo celkem 111 kolonií, které jsme použili k sekvenování. Celkem jsme získali 58 různých sekvencí o délkách v rozmezí od 62 do 756 bp. Z těchto 58 sekvencí se 18 opakovalo 2 – 4 krát. Tyto sekvence by se neměly vyskytovat v genomu DNA driveru (*B. cenocepacia* ST28). Nicméně 14 % sekvencí mělo shodu v celé délce inzertu s DNA driveru. Všechny sekvence jsme rozdělili do 5 skupin na základě jejich přítomnosti či absence v genomech druhů *Burkholderia*.

Skupina první (i) obsahovala 8 sekvencí, které vykazovaly > 80% podobnost s *B. cenocepacia* ST28, skupina (ii) byla tvořena čtyřmi sekvencemi s nízkou nukleotidovou či aminokyselinou sekvenční podobností (< 50%) s *B. cenocepacia* ST28. Skupina (iii) obsahovala 24 sekvencí, které měly sekvenční podobnost k jiným dosud publikovaným sekvencím Bcc. Předposlední skupina (iv) byla složená ze 14 sekvencí se sekvenční podobností k *Burkholderia* spp., ne však k Bcc. Poslední (v) skupinu tvořily sekvence, které neměly žádnou sekvenční podobnost k sekvencím dostupných v rámci *Burkholderia* spp., bylo jich celkem 8. Tabulka. č. 5 obsahuje všechny sekvence a jejich stručnou charakteristiku získanou z jednotlivých vyhledávačů (Publikace č.3)

Lze říci, že epidemický kmen *B. cenocepacia* ST32 obsahuje řadu mobilních elementů. Na základě GSH jsme odhalili části inserčních sekvencí a transponázy (sekvence 12G, 2C, 3A, 13B, 1G). Můžeme se také domnívat, že kmen ST32 bude mít ve své genetické výbavě plazmid. Inzert 13A dlouhý 144 bp má 97% shodu s částí plazmidu *B. cenocepacia* J2315. Další inzerty ukazují na přítomnost plazmidu - 4D, 1A a 8F, jejich sekvence mají 93 – 95% shodu s plazmidem *B. cenocepacia* HI2424 nebo s proteiny účastníci se konjugace plazmidu.

Jak bylo již zmíněno dříve, mezi významné faktory virulence patří sekreční systémy. My jsme pomocí GSH zjistili, že kmen ST32 obsahuje pravděpodobně sekreční systém IV. Kmen má totiž 90% shodu k domnělému proteinu VirB2 sekrečního systému IV *B. cenocepacia* J2315 (inzert 5G, délka 421 nukleotidů). Dále jsme prokázali 100% aminokyselinovou shodu k proteinové rodině Vgr sekrečního systému VI.

Dalším inzertem souvisejícím s virulentními faktory je sekvence kódující transkripční regulátor LysR rodiny, která se nachází za označením inzertu 2G. Transkripční regulátory rodiny LysR představují velice časté regulátory u prokaryot. Regulují řadu genů účastnících se metabolismu, virulence prokaryot, mezibuněčné komunikace QSS či motility (123). Další transkripční regulátory TetR rodiny jsou zahrnuty do transkripční kontroly effluxových pump, o kterých se také ví, že se u Bcc vyskytují a jsou příčinou zvýšené rezistence vůči

antibiotikům (124). My jsme ale objevili v naší sbírce inzertů pouze 43% aminokyselinovou shodu tohoto represoru v genomu ST32 (inzert 7D). Analýzou inzertů jsme odhalili i několik enzymů účastnících se metabolismu bakterií, dýchacího řetězce, proteiny signálních drah a proteiny hypotetické.

Tabulka č. 5 Analýza všech inzertů získaných pomocí GSH. Sekvence jsou uspořádány do skupin podle shody k organismům *Burkholderia* (podle sloupce Identita k celkové délce klonovaného inzertu). Sekvence byly analyzovány pomocí databází BLASTN a BLASTX NCBI a BGD. Konkrétní nástroje a databáze jsou uvedeny v případech, kdy jsme získali rozdílné výsledky. * Sekvence vybrané jako potenciální cíl pro navržení primerů pro specifickou PCR detekující kmen ST32. NSH žádná významná shoda. Tabulka použita z Publikace č. 3.

Skupina	ID sekvence	Délka (bp)	Vyhledávač	Nejlepší shoda: organismus	Nejlepší shoda: kódující oblast nebo protein	Identita v BLASTu	Identita k celkové délce klonovaného inzertu	E-hodnota
Skupina (i)	2C	83		B. cenocepacia J2315	putative membrane protein	83/83 (100%)	100% (bp)	7,00E-35
	7G	208		B. cenocepacia J2315	DNA Gyrase, subunit A	207/208 (99%)	99% (bp)	4,00E-102
	2E	609		B. cenocepacia J2315	putative aminotransferase	598/638 (94%)	98% (bp)	0.0
	13A	144		B. cenocepacia J2315	pBCJ2315 plasmid	140/143 (98%)	97% (bp)	7,00E-63
	1A	474		B. cenocepacia J2315	glycosyltransferase	451/458 (98%)	95% (bp)	0.0
	3D	260	NCBI BlastN	B. cenocepacia J2315	putative ion transporter	243/251 (97%)	93% (bp)	3,00E-114
			NCBI BlastX	Schistosoma mansoni	hypothetical protein	21/61 (34%)	24% (aa)	4,11E+04
			BGD BlastX	B. phymatum STM815	hypothetical protein	23/65 (35%)	27% (aa)	4,11E+04
	5G	421		B. cenocepacia J2315	putative type IV secretion system protein VirB2	379/399 (95%)	90% (bp)	3,00E-176
	1H	608	NCBI BlastN	B. cenocepacia J2315	putative membrane protein	488/610 (80%)	80% (bp)	3,00E-122
			NCBI BlastX	Burkholderia sp. 383	hypothetical protein	181/202 (90%)	89% (aa)	3,00E-130
			BGD BlastX	Burkholderia sp. 383	hypothetical protein	181/202 (89%)	89% (aa)	e-107
Skupina (ii)	2F	190	NCBI BlastN	NSH				
			NCBI BlastX	Parasutterella excrementihominis YIT	serine protease MucD	30/62 (48%)	47% (aa)	1,00E-10

				11859				
			BGD BlastX	B. cenocepacia J2315	subfamily S1B serine peptidase	27/62 (43%)	43% (aa)	5,00E-10
	5B*	583		B. cenocepacia J2315	potassium-transporting ATPase A chain	218/218 (100%)	37% (bp)	7,00E-109
	5E	188	NCBI BlastN	B. cenocepacia J2315	putative allantoicase	55/56 (98%)	29% (bp)	4,00E-17
			NCBI BlastX	Burkholderia sp.	allantoicase	18/24 (75%)	29% (aa)	5,00E-06
			BGD BlastX	B. pseudomallei	allantoicase	18/24 (75%)	29% (aa)	6,00E-06
	1F	238	NCBI BlastN	NSH				
			NCBI BlastX	Ps. aeruginosa LESB58	unnamed protein product	37/78 (47%)	47% (aa)	1,00E-18
			BGD BlastX	B. cenocepacia J2315	family M22 non-peptidase-like protein	16/45 (35%)	20% (aa)	4,09E+04
	Skupina (iii)	12G	282		B. cenocepacia HI2424	transposase IS3/IS911 family protein	282/282 (100%)	100% (bp)
2F		85	NCBI BlastN	Burkholderia sp. KJ006	rRNA-23S ribosomal RNA	85/85 (100%)	100% (bp)	6,00E-36
			NCBI BlastX	B. multivorans ATCC 17616	cell wall-associated hydrolase	28/28 (100%)	100% (aa)	6,00E-11
			BGD BlastX	NSH				
9B		62	NCBI BlastN	NSH				
			NCBI BlastX	B. ambifaria	type VI secretion system Vgr family protein	20/20 (100%)	100% (aa)	2,00E-04
			BGD BlastX	B. glumae BGR1	Rhs element Vgr protein	19/20 (95%)	95% (aa)	2,00E-04
7C		517		B. cenocepacia MC0-3	hypothetical protein	514/517 (99%)	99% (bp)	0.0
2C		565		Burkholderia sp. 383	Transposase Tn3	537/565 (95%)	95% (bp)	0.0
4D		175	NCBI BlastN	B. cenocepacia HI2424	plasmid 1	167/170 (98%)	95% (bp)	9,00E-78
	NCBI BlastX		B. cenocepacia HI2424	conjugal transfer mating pair stabilization protein TraN	57/58 (98%)	98% (aa)	3,00E-34	

		BGD BlastX	NSH				
11G	99	NCBI BlastN	NSH				
		NCBI BlastX	B. cenocepacia HI2424	hypothetical protein	32/32 (100%)	97% (aa)	1,00E-12
		BGD BlastX	B. cenocepacia HI2424	hypothetical protein	32/32 (100%)	97% (aa)	5,00E-12
9C	125	NCBI BlastN	B. cenocepacia strain Y5	esmR-like gene	120/122 (98%)	96% (bp)	6,00E-53
		NCBI BlastX	Aerococcus viridans ATCC 11563	carbamoylphosphate synthase large subunit	16/34 (47%)	38% (aa)	4,11E+04
		BGD BlastX	B. pseudomallei	hypothetical protein	13/27 (48%)	31% (aa)	4,10E+04
1A	310		B. cenocepacia HI2424	plasmid 1	287/310 (93%)	93% (bp)	6,00E-122
8F	322		B. cenocepacia HI2424	plasmid	301/321 (94%)	93% (bp)	4,00E-133
1G/2	230	NCBI BlastN	B. cenocepacia MC0-3	hypothetical protein	209/230 (91%)	91% (bp)	2,00E-80
		NCBI BlastX	NSH				
		BGD BlastX	B. glumae BGR1	polyketide synthase	10/20 (50%)	13% (aa)	4,12E+04
8B	112		Burkholderia sp. 383	Rhs element Vgr protein	102/109 (94%)	91% (bp)	2,00E-37
3A	682		B. cenocepacia HI2424	transposase Tn3 family protein	612/678 (90%)	90% (bp)	0.0
1E	220	NCBI BlastN	NSH				
		NCBI BlastX	B. ambifaria MEX-5	diguanylate cyclase	60/72 (83%)	82% (aa)	3,00E-33
		BGD BlastX	B. dolosa AUO158	hypothetical protein	62/72 (86%)	85% (aa)	8,00E-30
2B	97	NCBI BlastN	NSH				
		NCBI BlastX	B. cenocepacia HI2424	hypothetical protein	27/31 (87%)	84% (aa)	2,00E-11
		BGD BlastX	B. cenocepacia HI2424	hypothetical protein	27/31 (87%)	84% (aa)	3,00E-10
2B/2	551	NCBI BlastN	NSH				
		NCBI BlastX	B.multivorans ATCC 17616	type 11 methyltransferase	141/167 (84%)	77% (aa)	3,00E-97

		BGD BlastX	B. multivorans ATCC 17616	type 11 methyltransferase	141/167 (84%)	77% (aa)	2,00E-80
3B	170	NCBI BlastN	NSH				
		NCBI BlastX	B. ubonensis Bu	hypothetical protein	39/56 (70%)	70% (aa)	1,00E-20
		BGD BlastX	B.cenocepacia MC0 3	hypothetical protein	37/46 (80%)	66% (aa)	3,00E-17
9B/2	756	NCBI BlastN	NSH				
		NCBI BlastX	B.multivorans ATCC 17616	hypothetical protein	165/205 (80%)	65% (aa)	3,00E-111
		BGD BlastX	B.multivorans ATCC 17616	hypothetical protein	165/205 (80%)	65% (aa)	e-110
12C	100	NCBI BlastN	Burkholderia sp. YI23	rRNA-23S ribosomal RNA	100/100 (100%)	100% (bp)	3,00E-44
		NCBI BlastX	B. multivorans ATCC 17616	hypothetical protein	22/23 (96%)	67% (aa)	2,00E-09
		BGD BlastX	B. multivorans ATCC 17616	hypothetical protein	22/23 (95%)	67% (aa)	2,00E-08
3H	435	NCBI BlastN	Cupriavidus metallidurans CH34	cytochrome-c oxidase	435/435 (100%)	100% (bp)	0.0
		NCBI BlastX	Cupriavidus metallidurans CH34	cytochrome-c oxidase	144/144 (100%)	99% (aa)	2,00E-97
		BGD BlastX	B. ambifaria	cytochrome-c oxidase	91/142 (64%)	63% (aa)	3,00E-55
11C	171	NCBI BlastN	NSH				
		NCBI BlastX	B. multivorans ATCC 17616	hypothetical protein	33/56 (59%)	58% (aa)	4,00E-14
		BGD BlastX	B. multivorans ATCC 17616	hypothetical protein	33/56 (58%)	58% (aa)	1,00E-13
10G	303	NCBI BlastN	Equus caballus	subtracted library fragment 51	45/48 (94%)	45% (bp)	4,00E-09
		NCBI BlastX	B. multivorans ATCC 17616	hypothetical protein	32/56 (57%)	32% (aa)	2,00E-12
		BGD BlastX	B. multivorans ATCC 17616	hypothetical protein	32/56 (57%)	32% (aa)	1,00E-12

	7D*	696	NCBI BlastN	NSH				
			NCBI BlastX	NSH				
			BGD BlastX	Burkholderia 383	TetR family transcriptional regulator	99/135 (73%)	43% (aa)	5,00E-52
	1C	178	NCBI BlastN	NSH				
			NCBI BlastX	B. graminis C4D1M	Alcohol dehydrogenase zinc-binding domain protein	20/52 (38%)	34% (aa)	2.0
			BGD BlastX	B. ambifaria AMMD	cytochrome c	15/30 (50%)	25% (aa)	4,12E+04
Skupina (iv)	13B	573	NCBI BlastN	B. phymatum STM815	transposase IS116/IS110/IS902 family protein	511/572 (89%)	89% (bp)	0.0
			NCBI BlastX	Burkholderia sp. TJI49	transposase IS116/IS110/IS902 family protein	190/190 (100%)	99% (aa)	3,00E-94
			BGD BlastX	B. phymatum STM815	transposase IS116/IS110/IS902 family protein	150/190 (78%)	79% (aa)	5,00E-75
	2A	153	NCBI BlastN	Cupriavidus metallidurans CH34	relaxase	153/153 (100%)	100% (bp)	2,00E-73
			NCBI BlastX	Ps. aeruginosa 2192	hypothetical protein	50/50 (100%)	98% (aa)	6,00E-16
			BGD BlastX	B. xenovorans LB400	hypothetical protein	34/50 (68%)	67% (aa)	3,00E-12
	1G	108		B. thailandensis E264	transposase, mutator family protein	99/108 (92%)	92% (bp)	1,00E-33
	6B	138	NCBI BlastN	Ps. aeruginosa LESB58	hypothetical protein	138/138 (100%)	100% (bp)	4,00E-65
			NCBI BlastX	Stenotrophomonas maltophilia D457	hypothetical protein	45/45 (100%)	98% (aa)	5,00E-22
			BGD BlastX	Burkholderia sp.	hypothetical protein	35/45 (77%)	76% (aa)	8,00E-14
	1B/2	581	NCBI BlastN	NSH				
			NCBI BlastX	Burkholderia sp.	Capsule polysaccharide	118/172 (69%)	61% (aa)	8,00E-77

				biosynthesis protein			
		BGD BlastX	B. pseudomallei	capsule polysaccharide biosynthesis	111/169 (65%)	57% (aa)	5,00E-61
2G	106	NCBI BlastN	Herminiimonas arsenicoxydans	Putative transcription regulator, LysR family	102/106 (96%)	96% (bp)	8,00E-41
		NCBI BlastX	Herminiimonas arsenicoxydans	LysR family transcriptional regulator	33/34 (97%)	93% (aa)	7,00E-15
		BGD BlastX	B. phytofirmans PsJN	LysR family transcriptional regulator	21/34 (61%)	59% (aa)	3,00E-06
9F	475	NCBI BlastN	NSH				
		NCBI BlastX	B. terrae	ubiquinol-cytochrome c reductase, iron-sulfur subunit	81/127 (64%)	51% (aa)	1,00E-49
		BGD BlastX	B. phytofirmans	ubiquinol-cytochrome c reductase	74/127 (58%)	47% (aa)	2,00E-41
5H*	264	NCBI BlastN	NSH				
		NCBI BlastX	Cellvibrio sp. BR	hypothetical protein	79/87 (91%)	90% (aa)	3,00E-48
		BGD BlastX	B. thailandensis_E264	phospholipase C	29/77 (37%)	33% (aa)	0.26
14C	127	NCBI BlastN	NSH				
		NCBI BlastX	NSH				
		BGD BlastX	B. pseudomallei	hypothetical protein	13/29 (44%)	31% (aa)	4,10E+04
9C	401	NCBI BlastN	Ps. aeruginosa LESB58	conserved hypothetical protein, AAA ATPase, central domain protein	400/401 (99%)	99% (bp)	0.0
		NCBI BlastX	Stenotrophomonas maltophilia D457	hypothetical protein	64/66 (97%)	48% (aa)	4,00E-35
		BGD BlastX	Burkholderia sp.	AAA ATPase central domain-containing	36/55 (65%)	27% (aa)	5,00E-14
4G*	269	NCBI BlastN	NSH				
		NCBI BlastX	B. xenovorans LB400	Putative	18/27 (67%)	20% (aa)	0.020

	8C/2	223	BGD BlastX	B. xenovorans LB400	integrase/recombinase	18/27 (66%)	20% (aa)	0.001
			NCBI BlastN	NSH				
			NCBI BlastX	Uncinocarpus reesii 1704	hypothetical protein	18/36 (50%)	24% (aa)	4,09E+04
	1B*	526	BGD BlastX	B. phymatum STM815	hypothetical protein	13/41 (31%)	18% (aa)	0.45
			NCBI BlastN	NSH				
			NCBI BlastX	B. phymatum STM815	hypothetical protein	31/56 (55%)	18% (aa)	2,00E-10
	2E*	427	BGD BlastX	B. phymatum STM815	hypothetical protein	31/56 (55%)	18% (aa)	2,00E-10
			NCBI BlastN	NSH				
			NCBI BlastX	Roseomonas cervicalis	hypothetical protein	21/45 (47%)	15% (aa)	0.11
	7F	193	BGD BlastX	B. pseudomallei	flavoprotein reductase	19/58 (32%)	13% (aa)	0.18
			NCBI BlastN	Cupriavidus metallidurans	nthA gene for nitrilase	191/194 (98%)	99% (bp)	2,00E-90
			NCBI BlastX	Cupriavidus metallidurans	nitrilase, partial	55/60 (92%)	86% (aa)	3,00E-33
Skupina (v)	2D	162	BGD BlastX	NSH				
			NCBI BlastN	NSH				
			NCBI BlastX	Thiorhodococcus dreusii AZ1	Ribonuclease H	25/44 (57%)	46% (aa)	1,00E-11
	11A	161	BGD BlastX	NSH				
			NCBI BlastN	NSH				
			NCBI BlastX	Rhodobacterales bacterium HTCC2150	HNH nuclease	22/50 (44%)	41% (aa)	1,00E-04
	8C	142	BGD BlastX	NSH				
			NCBI BlastN	NSH				
			NCBI BlastX	NSH				
			BGD BlastX	NSH				
			NCBI BlastN	NSH				
			NCBI BlastX	NSH				

			NCBI BlastX	Vibrio shilonii AK1	diguanylate cyclase	17/40 (43%)	36% (aa)	4,09E+04
			BGD BlastX	NSH				
	2H	93		NSH				
	4A	138		NSH				
	8A	193		NSH				
	8E*	303		NSH				

3.3. Kmenově specifická PCR pro kmen *Burkholderia cenocepacia* ST32 (ST32-PCR)

Použitím GSH jsme získali v 86 % sekvence s podobností < 50% s *B. cenocepacia* ST28. Z těchto získaných sekvencí jsme vybrali 7 kandidátních sekvencí pro navržení nové PCR, která by specificky detekovala přítomnost epidemického kmene *B. cenocepacia* ST32 v klinickém materiálu a určila tak přes více než 50 % všech klinických Bcc pozitivních vzorků. Kandidátní sekvence byly vybrány na základě nízké homologie (nukleotidové či aminokyselinové) k druhům Bcc. Kandidátní sekvence, které se použily k ST32-PCR jsou vyznačeny v Tabulce č. 5 hvězdičkou.

3.3.1. Metodika ST32-PCR

ST32-PCR

Primery pro vybrané cílové sekvence byly navrženy pomocí volně dostupného internetového nástroje Primer Design Assistant. PCR byla prováděna v duplikátech o celkovém objemu 20 µl s 1 µl vyextrahované DNA, chemikálie byly použity z kitu *Taq* PCR Core (Qiagen): 1x PCR pufr, 1x Q-solution, 0,2mM dNTP každý, 0,5µM 1B_325F a 0,5µM 1B_325R primer. PCR program byl složen z počáteční denaturace 94°C, 5 min, následovalo 30 cyklů tvořených z denaturace při 94°C, 30 s; nasednutí primerů 60°C, 45 s; 72°C, 2 min. Délka produktů byla ověřena pomocí 2% agarozové gelové elektroforézy v 1x TBE pufru, 6V/cm.

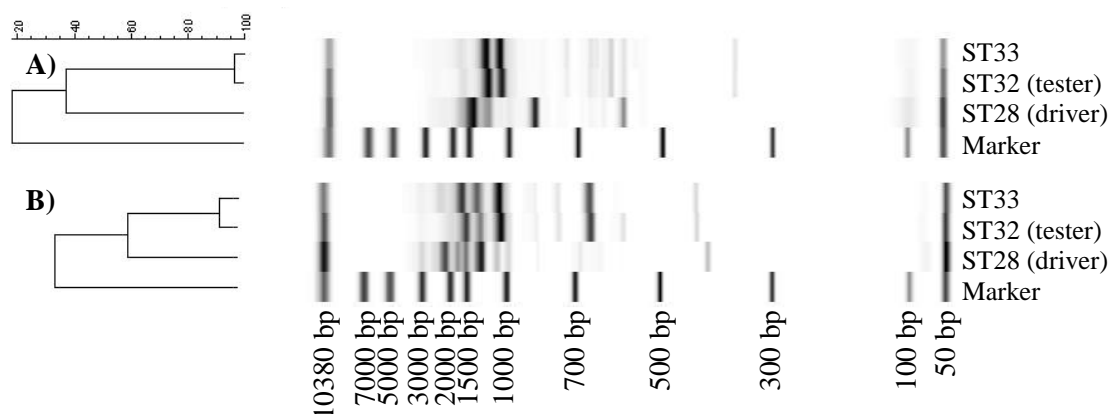
Testování citlivosti a specificity ST32-PCR

Citlivost a specifická reakce se testovala za pomoci panelu 57 kmenů Bcc z Cardiffské sbírky referenčních kmenů, 16 kmenů, které se mohou vyskytnout v plicích pacientů s CF (*Pseudomonas syringae* CCM2868, *Pseudomonas aeruginosa* epidemický kmen z Manchesteru C3652, *Pseudomonas stutzeri* LMG11199, *Pseudomonas pseudoalcaligenes* LMG1225, *Pandorea apista* LMG16407, *Pandorea pnomenusa* LMG18087, *Ralstonia pickettii* LMG18088, *Ralstonia insidiosa* LMG18101, *Ralstonia mannitolytica* LMG18103, *Pandorea pulmonicola* LMG18106, *Achromobacter xylosoxidans* LMG1863, *Pandorea sputorum* LMG18819, *Inquilinus limosus* LMG20952, *Cupriavidus respiraculi* LMG21510, *Pseudomonas putida* LMG2257 and *Stenotrophomonas maltophilia* LMG958) a od 50 pacientů s CF jsme otestovali 50 izolátů potvrzených genotypizačními metodami jako ST32. Detekční limit ST32-PCR byl stanoven sériovým ředěním DNA, která byla extrahovaná ze

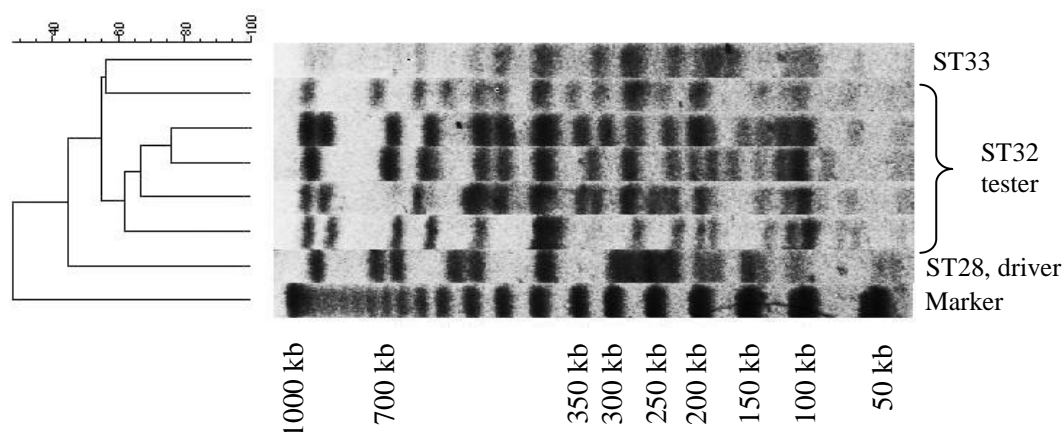
zásobní kultury o známé koncentraci CFU/ml (CFU, colony forming units) podle publikovaného postupu (125).

3.3.2. Výsledky ST32-PCR

Všech 7 vybraných sekvencí, na které jsme navrhli primery, jsme podrobili prvnímu screeningu specifity PCR na kmenech, které jsou úzce příbuzné k *B. cenocepacia* ST32: jednalo se o ST33, ST210, ST211, ST276, ST31 a ST28. Tímto screeningem prošly pouze 4 páry primerů odpovídajících 4 sekvencím, nicméně i tyto páry amplifikovaly odpovídající PCR produkt pro kmen *B. cenocepacia* ST33. Tento kmen se liší od českého epidemického kmene v jednom nukleotidovém polymorfismu konkatované sekvence dlouhé 2 733 bp, která je tvořená 7 geny v rámci MLST. Ani ostatními metodami genotypizace (RAPD, PFGE) jsme nedokázali tyto kmeny od sebe odlišit viz Obrázek č. 8 a 9. Výskyt kmene ST33 je lokalizován pouze v Kanadě, kde se epidemicky rozšířil i kmen ST32. Lze tedy kmen ST33 pokládat za klon ST32. Ačkoliv specifita všech testovaných párů primerů nedosahovala 100 %, pokračovali jsme v testování citlivosti PCR u zbývajících 4 párů primerů. U dvou dvojic primerů jsme zaznamenali falešně negativní výsledek a to byl důvod k jejich vyloučení z dalšího testování. Dva páry primerů, jejichž cílené sekvence byly 4G a 1B dosáhly 100% citlivosti. Konečný pár primerů pro ST32-PCR jsme vybrali na základě delšího amplifikovaného produktu. Cílovou strukturou se stala sekvence 1B o délce 526 bp, protože na ni navržené primery amplifikují produkt dlouhý 325 bp, v případě 4G byl produkt dlouhý 260 bp. Posledním krokem v testování ST32-PCR bylo testování zkřížené reaktivity. Testováním 16 bakteriálních druhů, které se mohou vyskytnout v plicích pacientů s CF, jsme nezaznamenali jakoukoli zkříženou reakci. Detekční limit ST32-PCR byl stanoven $4 \cdot 10^3$ CFU/ml.



Obrázek č. 8 RAPD fingerprintové profily kmenů *B. cenocepacia* ST28, ST32 a ST33. **A)** použit RAPD primer 270, **B)** použit primer RAPD 272. ST32 byl použit jako tester DNA a ST28 jako driver (referenční) DNA v GSH. Kmen *B. cenocepacia* ST33 vykazuje zkříženou reaktivitu v ST32-PCR. Publikace č. 3.



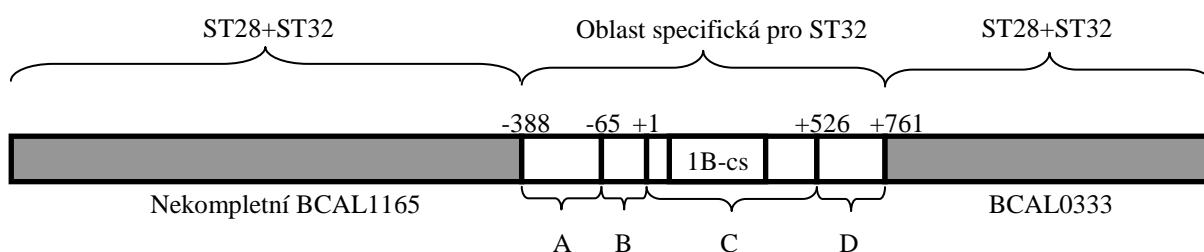
Obrázek č. 9 PFGE kmenů *B. cenocepacia* ST28, ST32 a ST33. Genomická DNA štěpená enzymem *SpeI*. Kmeny byly použity z Cardiffské sbírky referenčních kmenů: BCC0665 (J2315) ST28, BCC0961 ST32, BCC0560 ST33 a čtyři izoláty ST32 z vlastní sbírky klinických izolátů. Publikace č. 3.

Charakteristika cílové struktury pro ST32-PCR

K bližší charakteristice cílové struktury pro ST32-PCR jsme využili naší spolupráce s Ing. Hynkem Strnadem z Ústavu molekulární genetiky Akademie věd České republiky na celogenomovém sekvenování *B. cenocepacia* ST32. Na základě dosud nepublikovaných výsledků sekvenování genomu ST32 jsme dokázali blíže popsat jak oblast, na kterou jsou navrženy primery pro ST32-PCR, tak oblasti nacházející se v bezprostředním okolí.

Sekvence 1B získaná z GSH je dlouhá 526 bp a je součástí fragmentu, který je dlouhý 1 149 bp, což je zobrazeno na Obrázku č. 10. Tento frangment se skládá z: **(A)** 323 bp dlouhé

sekvence, která je homologní k části transponázy ISBmu3, **(B)** 65 bp dlouhé oblasti bez žádné významné shody **(C)** 526 bp dlouhé sekvence, která odpovídá 1B oblasti získané z GSH, v této oblasti se nachází cílová struktura pro ST32-PCR (**1B-cs**), tato část neobsahuje žádné kódující oblasti, ani nekódující RNA a v genomu ST32 se nachází pouze v jedné kopii, **(D)** fragment dlouhý 235 bp je homologní k fragmentům pro hypotetické proteiny. Oblasti nacházející se na obou stranách od této 1 149 bp dlouhé oblasti jsou lokalizovány v genomu ST28, který byl v GSH použit jako referenční kmen. Na jedné straně se nachází nekompletní kódující oblast pro sekreční systém VI proteinové rodiny Vgr - BCAL1165. Tento gen je v genomu J2315 dlouhý 2 508 bp, v genomu ST32 se nachází pouze 1 746 bp. Na druhé straně od sekvence specifické pro genom ST32 se nachází kompletní sekvence genu pro hypotetický protein BCAL0333.



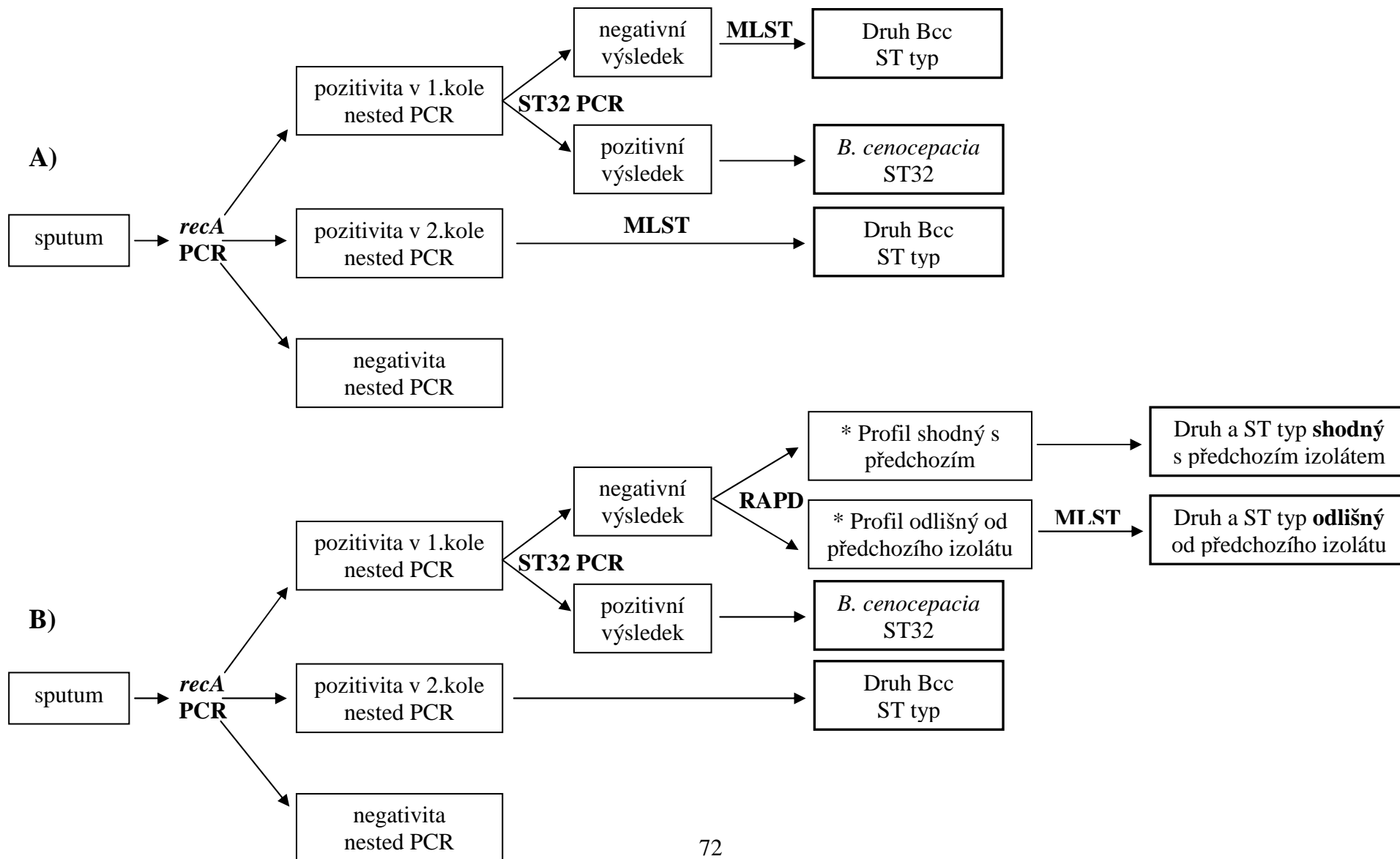
Obrázek č. 10 Charakteristika DNA oblasti v genomu ST32 obsahující cílovou sekvenci pro navržení primerů pro ST32-PCR. Bíle zbarvené oblasti představují oblast specifickou pro ST32, šedě zbarvené oblasti reprezentují oblasti společné pro ST28 a ST32. 1B-cs: cílová struktura pro ST32-PCR. Použito z Publikace č. 3.

3.4. Systém mikrobiologické surveillance Bcc infekcí ve FN v Motole

Jedním z cílů předkládané práce je zavedení systému mikrobiologické surveillance Bcc infekcí v největším českém CCF při FN v Motole, tak abychom zamezili případnému šíření epidemického kmene, ať už již v české populaci popsaného *B. cenocepacia* ST32 či nového. Základem vyšetřovacího schématu se stala kombinace genotypizačních metod (RAPD, MLST) a kmenově specifická PCR pro kmen ST32 (ST32-PCR). Pomocí těchto metod určujeme všechny pozitivní vzorky na Bcc na úroveň kmene. Systém se skládá ze dvou podsystémů (Schéma č. 3A, B): jeden je navržený pro vyšetřování nové infekce Bcc (**A**) a druhý pro chronický typ infekce (**B**). U prvozáchyty infekce vyšetření provádíme u pacientů s potvrzenou Bcc pozitivitou. U chronicky infikovaných pacientů vyšetření na úroveň kmene provádíme pouze jednou za rok, abychom potvrdili, že infekce je způsobená stále stejným kmenem a došlo-li u pacienta k nahrazení původního kmene kmenem novým, abychom určili nový kmen a adekvátně protiepidemicky zareagovali.

V obou podsystémech se nejprve vyšetřuje pozitivita vzorku na Bcc pomocí nested *recA* PCR. Určíme-li pozitivitu už v prvním kole, následuje v obou případech provedení ST32-PCR. Pozitivita ST32-PCR potvrdí infekci způsobenou kmenem *B. cenocepacia* ST32. V případě negativního výsledku je vzorek podroben genotypizační metodě MLST u prvozáchyty infekce, která určí druhovou a kmenovou příslušnost Bcc. U chronické infekce přistupujeme ke genotypizační metodě RAPD. Výsledkem je fingerprintový profil, který porovnáváme za pomoci softwaru BioNumerics (Applied Maths) s profilem předchozího vyšetřovaného izolátu. Shoda profilů potvrzuje infekci stejným kmenem. Neshoda profilů znamená provedení MLST a určení nového kmene, který nyní způsobuje infekci Bcc u pacienta. Nemáme-li k dispozici profil předchozího izolátu, musíme provést RAPD i pro předchozí izolát. Pozitiva *recA* PCR až v druhém kole v obou podsystémech vede k aplikaci MLST.

Schéma č. 3 Systém surveillance infekcí Bcc v LMG Pediatrické kliniky a ÚLM. **A)** prvozáchyt infekce Bcc; **B)** chronická infekce. *Pokud RAPD profil není pro předchozí izolát k dispozici, musí se RAPD provést pro oba izoláty – pro předchozí a současný izolát. Schéma použito z Publikace č. 3.



3.5. Diskuze

V předchozí kapitole jsme se přesvědčili, že naše diagnostika představuje pevné základy pro kontrolu infekcí způsobených Bcc. Optimalizovali jsme podmínky, testovali referenční kmeny, abychom mohli stavět na našich základech a vytvořit funkční systém kontroly infekce spočívající v určení Bcc až na úroveň kmene u všech infikovaných pacientů s CF. Po rozumné rozvaze nad získanými výsledky z našeho testování genotypizačních metod jsme dospěli k vytvoření systému, který akceptuje veškeré nároky kladené na tento systém. Zohlednili jsme klady a zápory jednotlivých metod - jejich schopnost typizovat kmen, reprodukovatelnost, časovou náročnost, náročnost provedení, snadnost vyhodnocení výsledku a také finanční aspekty jednotlivých metod.

Multilokusová sekvenční typizace (MLST) představuje v současné době metodu, která je schopná určit jak druhovou, tak kmenovou příslušnost Bcc. Navíc její převedení do nested schématu přidává této metodě na významu. Jsme totiž schopni určit původce infekce až na úroveň kmene přímo z klinického materiálu, nejsme tudíž bezprostředně závislí na kultivačním záchytu. Do té doby jsme z materiálu byli schopni určit pouze druhovou příslušnost pomocí genomovarizační reakce, která postupně ztrácela na svém významu a účinnosti z důvodu narůstajícího počtu druhů v komplexu. Byla schopná určit pouze prvních 7 druhů z Bcc, což při současném stavu 17 členů v komplexu, je nedostačující. Nevýhodou MLST je její finanční náročnost. Ta nás nutí tuto metodu používat v situacích, které si to vyžadují (Schéma č. 4). Z tohoto důvodu jsem hledali vhodnou, levnější i časově méně náročnější alternativu. Tím se stala metoda náhodné amplifikace polymorfních úseků DNA (RAPD). Oproti elektroforéze v pulzním je časově nenáročná, snadno proveditelná a reproducibilní. Víme o jejím nedostatku, že není schopná od sebe odlišit kmeny v rámci klonálního komplexu, proto tomu předcházíme a každá nová infekce je nejdříve typizována MLST a RAPD přichází na řadu až při monitorování infekce.

Jelikož se v naší populaci pacientů s CF vyskytuje majoritně epidemický kmen *B. cenocepacia* ST32, rozhodli jsme se pro něj navrhnout specifickou detekční metodu (ST32-PCR), která nám určí infekci u více jak 50 % všech vzorků, které by jinak byly určeny ke genotypizaci zmiňovanými metodami. K tomu jsme využili genomickou subtraktivní hybridizaci, kterou aplikovali již dříve Liu et al. (126) k navržení PCR pro rychlý screening epidemického kmene PHDC na evropském kontinentě (50). V našem případě ST32-PCR umožní diagnostikovat infekci *B. cenocepacia* ST32 bez nutnosti použití časově náročných a dražších metod genotypizace. Ačkoliv její specifita dosahuje 98,2 % z důvodu zkřížené

reaktivity s kmenem *B. cenocepacia* ST33, na základě použití 3 genotypizačních metod (MLST, RAPD, PFGE) jsme zjistili, že tyto kmeny nelze prakticky od sebe odlišit. Kmeny ST32 a ST33 tak můžeme považovat za jednu klonální linii. Navíc výskyt kmene ST33 je lokalizován pouze na jednu geografickou oblast v Kanadě, kde se vyskytl i kmen ST32. Skutečnosti, že genotypizační metody neodliší tyto kmeny od sebe a geografická lokalizace kmene ST33, nám nepřipadají dostatečně relevantní k tomu, abychom tuto PCR nevyužívali v našem surveillance systému. Je totiž naopak schopna odlišit epidemiologicky významné a příbuzné kmeny Bcc, například kmeny epidemické linie ET12, epidemický kmen PHDC. Pomocí genomické subtraktivní hybridizace jsme blíže charakterizovali epidemický kmen z hlediska přítomných faktorů virulence či plasticity genomu.

4. EPIDEMIOLOGIE INFEKČÍ BAKTERIÍ KOMPLEXU *BURKHOLDERIA CEPACIA* VE FAKULTNÍ NEMOCNICI V MOTOLE

Cíl: Zhodnocení epidemiologické situace infekcí Bcc v CCF ve FN v Motole.

Důvod: Dochází k šíření infekce způsobené epidemickým kmenem *B. cenocepacia* ST32 přes veškerá protiepidemická opatření, která byla v CCF ve FN v Motole zavedena?

Autorská publikace k tématu: Publikace č. 2

4.1. Studium epidemiologické situace

Ke zmapování epidemiologické situace Bcc a k určení kmene, který infekci způsobuje, jsme použili genotypizační metody RAPD a/nebo MLST, kterým jsme se věnovali v přecházející kapitole. Těmito metodami jsme vyšetřovali jak všechny pacienty s infekcí Bcc za období od zavedení nested PCR v roce 2001 do konce roku 2010, tak stejným způsobem jsme vyšetřili i uchované bakteriální kultury od pacientů, jejichž infekce byla potvrzena v období před zavedením PCR, tedy od roku 1994 do dubna 2001.

U pacientů, od kterých jsme měli k dispozici čistou bakteriální kulturu, jsme použili jednodušší a rychlejší techniku RAPD. Pokud jsme získali nejasný či nový RAPD fingerprintový profil, který se v naší sbírce izolátů nevyskytoval, následovalo provedení MLST.

V případech, kdy byla infekce Bcc potvrzena pouze pomocí PCR, tedy kultivačně vyšla negativní (kultura nebyla k dispozici) jsme přistoupili k provedení nested MLST přímo z klinického materiálu.

ST typy jsme určovali i u pacientů z jiných center CF v České republice, abychom získali epidemiologickou představu o infekci způsobenou Bcc mimo hranice pražského centra. Nicméně tyto údaje jsme nezahrnuli do naší publikace (Publikace č. 2), protože pacienti nesplňovali podmínku pravidelných ambulantních kontrol v pražském CCF.

4.2. Výsledky

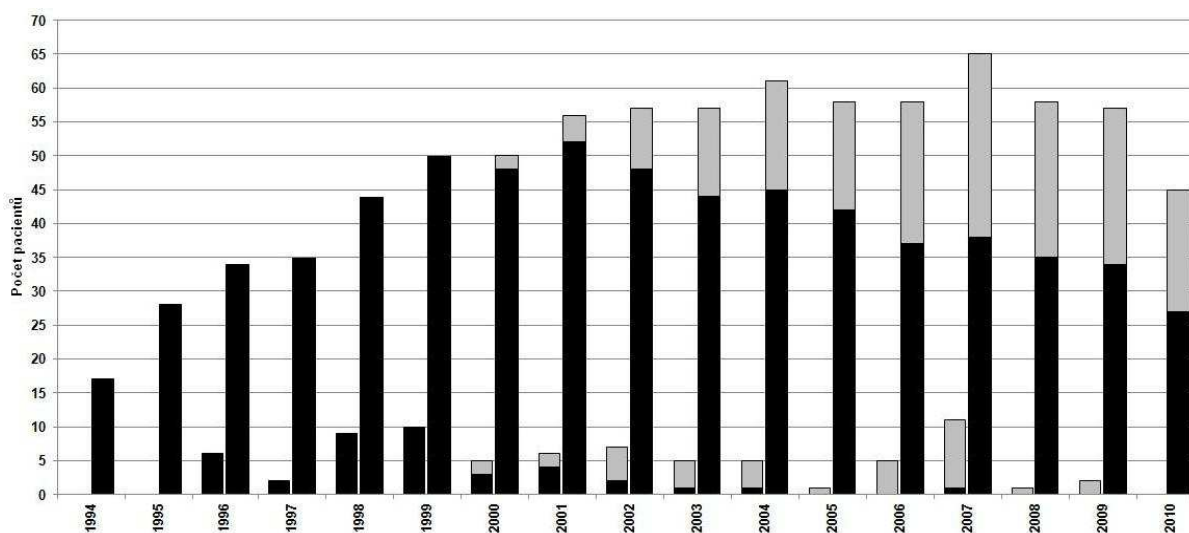
Za pomoci metod genotypizace jsme zmonitorovali druhovou a kmenovou distribuci Bcc v pražském CCF ve FN v Motole. Prevalence infekcí způsobené Bcc dosahovala téměř 30 % na konci roku 2001, o devět let později došlo k poklesu o 10 %. Prevalence infekcí Bcc a druhová distribuce je zobrazena v Tabulce č. 6. Pro lepší přehlednost jsou výsledky rozděleny do čtyř let vždy s tříletým intervalem od sebe. V populaci pražských pacientů s CF jsme za dané období popsali pouze 4 druhy z Bcc. Nejčastější druh v populaci CF byl druh *B. cenocepacia*. Kromě kmene ST32 se v rámci tohoto druhu objevil kmen ST234 u čtyř pacientů, u jednoho z nich se jednalo transientní infekci.

Konec roku	2001	2004	2007	2010
Počet pacientů s CF	194	225	250	243
Pacienti s infekcí Bcc (%)	56 (28,9)	61 (27,1)	65 (26,0)	45 (18,5)
<i>B. cenocepacia</i>				
ST32 (% ze všech Bcc)	52 (92,9)	45 (73,8)	38 (58,5)	27 (60,0)
jiné než ST32	2	8	8	7
<i>B. multivorans</i>	2	3	5	3
<i>B. stabilis</i>	0	3	7	4
<i>B. contaminans</i>	0	2	7	4

Tabulka č. 6 Druhová distribuce infekcí Bcc v CCF ve FN v Motole za období 2001-2010. (Publikace č.2)

Vývoj infekcí Bcc od roku 1994 do roku 2010 je znázorněn v Grafu č. 1. Od roku 1994 až do roku 1999 se v CCF ve FN v Motole vyskytla u pacientů infekce způsobená pouze epidemickým kmenem *B. cenocepacia* ST32. Od roku 2000 jsme monitorovali výskyt i jiných kmenů než *B. cenocepacia* ST32. V roce 2001 dochází ke snižování počtu pacientů s epidemickým kmenem, ale toto snižování je způsobeno úmrtím pacientů, nikoliv vyléčením. Poslední případ nové infekce kmenem ST32 spadá do roku 2007, nicméně tato pacientka přišla do CCF poprvé, poté co se přistěhovala do ČR ze Slovenské republiky a o své infekci již věděla. Tento případ nepovažujeme jako infekci získanou v prostorách našeho CCF, který by byl zapříčiněn porušením protiepidemických opatření. Jako poslední případ infekce

způsobené kmenem ST32 je tedy případ z roku 2004. Každý rok počet nově infikovaných pacientů Bcc nepřesáhl 10 případů, s jednou výjimkou v roce 2007. V roce 2004 jsme čelili epidemii *B. contaminans* ST102 na odděleních Pediatrické kliniky. Tímto kmenem bylo infikováno 5 dětských pacientů.



Graf č. 1 Vývoj infekce Bcc od roku 1994 až 2010. Data o incidenci v letech 1994 a 1995 nejsou poskytnuta. Černě zbarvené sloupce značí epidemický kmen, šedě zbarvené sloupce ostatní druhy Bcc. Publikace č.2.

Podařilo se nám zmapovat druhové a kmenové zastoupení Bcc. Zvýšený výskyt druhu *B. multivorans*, jak už jsme popsali v teoretickém úvodu, je současným trendem v některých populacích pacientů s CF. My jsme v našem CCF tento trend nepotvrdili. Zvýšený výskyt *B. multivorans* je zaznamenán i u pacientů, kteří jsou hospitalizováni například na jednotkách intenzivní péče. Poslední publikace zaměřená na české prostředí byla publikována v roce 2013 Hanulíkem et al., kde popsali dominantní výskyt kmene *B. multivorans* ST439, který se vyskytoval mezi pacienty bez CF na jednotce intenzivní péče ve FN v Olomouci (127).

Kromě výsledků z pražského CCF jsme například zjistili, že v CCF v Hradci Králové (HK) se u dvou dospělých pacientů vyskytuje stejný kmen, který jsme zcela poprvé popsali na základě provedené studie, jedná se *B. multivorans* ST616. V letech 2011 a 2012 jsme přítomnost tohoto kmene potvrdili u dalších 5 pacientů s CF v HK, ale také u pacientky bez CF, která byla hospitalizovaná na tamní plicní klinice. Hradecké pracoviště jsme o této situaci informovali a spolupracujeme na monitorování situace. CCF v HK se snaží dodržovat striktní protiepidemická opatření, aby nedošlo k dalšímu šíření tohoto kmene. Dále se v CCF v HK

vyskytovaly dva případy infekce *B. contaminans* ST102 a 3 případy epidemického kmene ST32. V brněnském centru jsme zmapovali výskyt 4 pacientů s kmenem ST32. Všechny tyto případy se týkají dospělých pacientů, kteří se účastnili v 90. letech společenských akcí pořádaných pro pacienty s CF, jejich infekce byla proto pravděpodobně získána během těchto akcí. Nový případ infekce kmenem ST32 jsme v jiných centrech nezaznamenali. V Ostravě jsme popsali u 4 pacientů výskyt kmene *B. cenocepacia* ST234. Tento kmen se vyskytuje i mezi pacienty pražskými, jedná se o jeden z rozšířených kmenů v Evropě. Pacienti získali kmen ST234 pravděpodobně z prostředí. Centrum v Ostravě bylo upozorněno na přítomnost tohoto kmene a pracoviště pacienty separovalo od pacientů bez infekce či od pacientů infikovaných jiným kmenem Bcc, aby nedošlo k potenciálnímu šíření infekce.

Nadále spolupracujeme s ostatními pracovišti v ČR, která mají ve své péči pacienty s CF, tak abychom jim v případě podezření šíření infekce Bcc poskytli pomoc a jednoznačnou odpověď, zda-li dochází k šíření nějakého kmene.

4.3. Diskuze

Aplikováním metod genotypizace jsme zmapovali populaci pacientů s CF infikovaných bakteriemi komplexu *Burkholderia cepacia*. Díky tomu jsme i zpětně popsali epidemiologickou situaci od roku 1994, kdy se začaly používat kultivační půdy pro diagnostiku Bcc. Můžeme konstatovat, že od roku 1994 byla infekce Bcc u pacientů způsobená epidemickým kmenem ST32. V té době docházelo ke strmému nárustu této infekce, který se zpomalil na přelomu let 2000 a 2001, kdy už byla zavedena veškerá protiepidemická opatření. V roce 1998 došlo k ukončení veškerých společenských akcí pořádaných pro pacienty s CF a došlo ke zřízení speciální ambulance pro pacienty s CF. O tři roky později se do rutinního provozu zavedla PCR s genomvarizační reakcí určující druhovou příslušnost Bcc. Tedy citlivější metoda detekce Bcc, která je schopna odhalit infekci dříve než kultivace, jak už jsme prokázali v první kapitole Speciální části. Striktně se také začal dodržovat izolační systém, pomocí kterého se pacienti separují na základě mikrobiologického nálezu do několika skupin: pacienti bez infekce, s infekcí PA, s infekcí Bcc podle druhu a s epidemickým kmenem. Tyto skupiny pacientů jsou zvány do ambulančí v jiné dny, tak aby se eliminovala pravděpodobnost přímého kontaktu mezi pacienty a přenos infekce. Stejný systém je dodržován při hospitalizaci a rehabilitaci na klinikách CCF, na jedno oddělení se neumisťují pacienti s jiným mikrobiologickým nálezem. K dalším opatřením patří osvojení správné hygieny rukou, používání preventivních barierových opatření (rukavice, masky), správné čištění a dezinfekce pomůcek k inhalování a ostatních předmětů, které mohou být kontaminovány a používání germicidních lamp v ambulancích na konci dne. Všechna tato opatření vedla k eliminaci možných cest přenosu. Poslední případ infekce kmenem ST32 je zaznamenán z roku 2004. Ostatní druhy z Bcc jsou v populaci zastoupeny v menšině a zbytek populace je heterogenní. Kmeny, které se v populaci vyskytují v počtu tří pacientů, jsou *B. contaminans* ST102 a *B. cenocepacia* ST234. Jejich počet se ale nezvyšuje. Můžeme s úlevou konstatovat, že v CCF ve FN v Motole nedochází k šíření epidemického kmene *B. cenocepacia* ST32 a ani jiný kmen tu není na vzestupu. Na této situaci se podílí včasná diagnóza infekce a dodržování všech protiepidemických opatření jak ze stran pacientů, jejich rodičů a rodin, tak zdravotního personálu.

5. STUDIUM VIRULENCE *BURKHOLDERIA CENOCEPACIA* ST32 POMOCÍ MODELOVÉHO ORGANISMU

Cíl: Zhodnotit virulenci kmene *B. cenocepacia* ST32 pomocí zvířecího modelu.

Důvod: Rozdílné klinické průběhy infekcí u pacientů s CF.

Hlavní důvod, který nás vedl k zahájení studie virulence *B. cenocepacia* ST32 na zvířecím modelu, bylo pozorování rozdílného průběhu infekce u našich pacientů. Pacienti infikovaní tímto kmenem vykazují delší dobu přežití než pacienti, kteří byli infikováni epidemickou linií ET12. Přes 60 % pacientů infikovaných epidemickou linií ET12 přežívá 5 let (30), u našich pacientů infikovaných kmenem ST32 je to 80 % pacientů (osobní komunikace s MUDr. Liborem Filou, Ph.D., CCF ve FN v Motole, dospělá část, předběžné výsledky). Nicméně kmen ST32 nepředstavuje mírnější alternativu v rámci Bcc, protože i tento kmen je schopen způsobit cepacia syndrom. V praxi se setkáváme s variabilními průběhy infekce. U některých pacientů infekce probíhá velice závažně, v minulosti jsme se setkali, že u nich došlo k rychlému zhoršení klinického stavu a v některých případech během jednoho roku až pěti let od získání infekce došlo k cepacia syndromu a pacienti zemřeli. U některých pacientů dochází k pozvolnému zhoršení klinického stavu, které však také může končit cepacia syndromem. Naopak u některých pacientů se setkáváme s velice mírným průběhem infekce, bez opakovaných exacerbací a pacienti jsou infikováni například více jak 15 let. Tyto rozdíly byly přiřítány pacientům, tedy rozdíly v průběhu infekce jsou ovlivněny pohlavím pacienta (ženy mívají horší průběh CF než muži), věkem pacienta, typem mutace v *CFTR* genu, podanou léčbou či jinou přidruženou infekcí (128), (129), (130). Chtěli jsme zjistit, zda uvidíme nějaké rozdíly ve virulenci a chování klinických izolátů získaných od pacientů z různých fází infekce na zvířecím modelu, který „netrpí“ rozdílnými vlastnostmi jako je to v případě pacientů.

Naše pracoviště není vybaveno na provádění studií virulence na zvířecích modelech. Všechny experimenty jsme prováděli na pracovišti ve Francii v laboratořích Lékařské fakulty Univerity Montpellier a Národního institutu pro zdraví a lékařský výzkum v Nîmes pod odborným vedením Dr. Annette Vergunst. Autorka této dizertační práce strávila celkem 3 měsíce na tomto pracovišti.

K poznání virulence a chování epidemického kmene *in vivo* jsme použili tři různé metody aplikované na modelovém organismu embrya *Dania pruhoanáho*, který je znám více jako akvarijní ryba - zebřička.

5.1. Modelový organismus – *Danio pruhoané* (*Danio rerio*)

Danio pruhoané je sladkovodní ryba pocházející z oblasti východní Indie, Vietnamu, Nepálu. Dospělá ryba dorůstá do velikosti 4 - 5 cm u přírodní formy Obrázek č. 11 A. Kromě přírodních forem existují geneticky modifikované tzv. transgenní formy Obrázek č. 11 B.

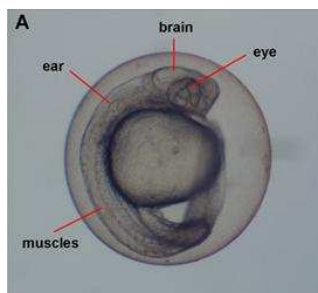


Obrázek č. 11 A) *Danio pruhoané*, nahoře samička, dole sameček; B) transgenní *Danio pruhoané*.

<http://www.akvarista.cz/web/atlas/detail/?id=244>; <http://www.gcas.org/threads/16143-Danio-rerio-%28Genetically-modified%29-Fluorescent-Zebra-Danios>;

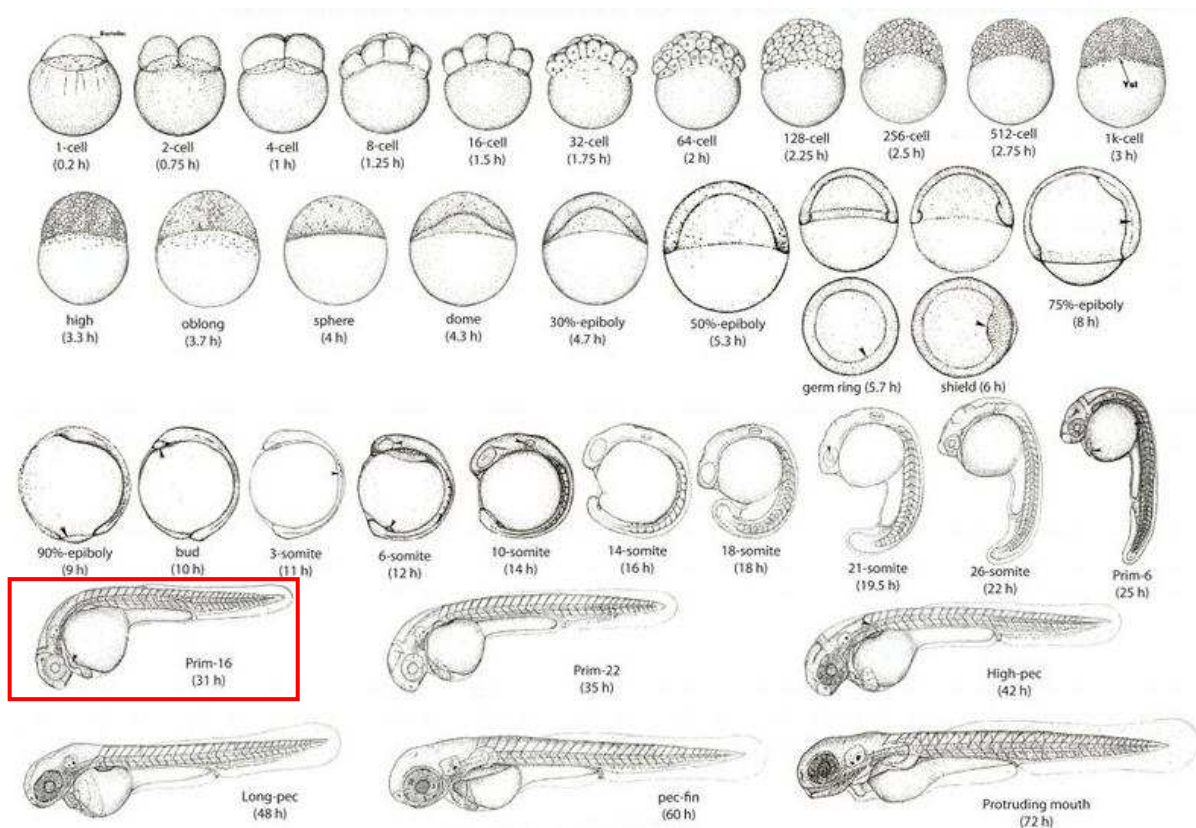
Danio pruhoané představuje modelový organismus, který se velice často využívá v oblastech studia molekulární biologie, genetiky, infekčních onemocnění či ke screeningu nových léčiv. Mezi hlavní důvody, proč se tento model tak široce využívá je fakt, že jeho imunitní systém vykazuje vysokou podobnost k lidskému imunitnímu systému, lze ho snadno geneticky modifikovat a jeho genom je kompletně osekvenovaný. Další výhody spočívají v krátkém generačním čase trvajícím 3 měsíce, samičky mohou naklást stovky vajíček týdně, oplodnění je externí a embrya jsou nakladeny přímo do vody (131).

Rovněž embrya *Dania pruhoaného* se využívají jako zvířecí model díky řadě nesporných výhod (Obrázek č. 12). Embrya se rychle vyvíjejí (během 2 až 4 dnů), činnost srdce a viditelné erytrocyty se objevují již 24 hodin po fertilizaci (hpf). Embryogeneze *Dania pruhoaného* je znázorněna na Obrázku č.13.



Obrázek č. 12 Embryo Danio pruhoaného v chorionu. <http://www.nc3rs.org.uk/news.asp?id=421>

Embrya jsou opticky transparentní, což umožňuje jednoduché a neinvazivní pozorování pomocí mikroskopu až na subcelulární úroveň. Během 18 hpf mají plně funkční makrofágy a neutrofily, fagocytóza je funkční během 28 – 32 hpf. Transientní genetická manipulace se provádí mikroinjekcí ve stádiu jedné buňky (132).



Obrázek č. 13 Embryogeneze Dania pruhoané do stádia 72 hpf. Červeně ohraničené embryo představuje stádium vývoje embrya, které se použilo ke studiu virulence. Převzato a upraveno: <http://www.sandeepkbhat.info/downloads.html>

5.2. Metodika studia virulence na modelovém organismu

První screeningová metoda určená ke studiu virulence je *Analýza přežití mikroorganismu v hostiteli*, která ozřejmí virulenci jednotlivých izolátů *in vivo* na základě zhodnocení procent živých embryí na konci experimentu. Další metoda blíže popisuje bakteriální replikaci v hostiteli v konkrétních časových intervalech po infikování – *Kinetická analýza*. Poslední metoda umožňuje sledovat průběh infekce a reakce složek hostitelského imunitního systému na infekci v reálném čase – *Analýza průběhu infekce v reálném čase*. Všechny zmiňované metody studia virulence byly vyvinuty na pracovišti ve Francii (133).

Pro tuto část jsme využili naši sbírku klinických izolátů od pacientů s CF, která obsahuje několik nejstarších izolátů pocházejících z 90. let 20. století, pravidelně se izoláty začaly sbírat od roku 2001. Tato sbírka nyní obsahuje izoláty od více než 100 pacientů, kteří měli infekci Bcc, z toho infekce u 65 pacientů byla způsobena epidemickým kmenem. Z této sbírky jsme vybrali 31 izolátů od 14 pacientů s CF (5 mužů, 9 žen). Izoláty pocházely z různých fází chronické infekce: 1) z klinicky stabilního stavu, 2) ze stavu před cepacia syndromem (poslední ambulantní kontrola) a 3) z terminální fáze infekce, z cepacia syndromu. Od jedenácti pacientů jsme otestovali dva a více izolátů, od zbylých třech pacientů jsme více izolátů nemohli otestovat, příčinou byl nedostatečný růst bakterií potřebný pro tyto experimenty.

Přehledná Tabulka č. 7 ukazuje vybrané izoláty s informacemi o stavu infekce.

Tabulka č. 7 Seznam izolátů, které byly vybrány pro Analýzu přežití mikroorganismu v hostiteli. * Izoláty použity pro Analýzu infekce v reálném čase a Kinetickou analýzu. CS cepacia syndrom.

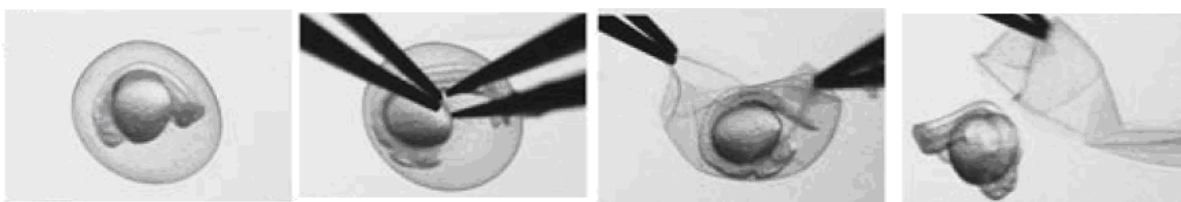
Pacient	ID izolátu	Fáze infekce	Materiál	Datum izolace	Virulentní skupina	% embryí, která přežila 120 hpi
A	Bcc0961	stabilní	sputum	6.6.2002	2	48,33
	8162	stabilní	sputum	1.11.2010	1	97,78
B	1634	stabilní	sputum	30.1.2001	2	47,46
	7532	stabilní	sputum	30.4.2010	3	0
C	X125	první dochovaný izolát	sputum	1998	2	21,62
	1256	stabilní	sputum	13.3.2003	2	53,73
	6914	stabilní	sputum	2.10.2009	3	8,19
	8097	1 měsíc před CS	sputum	27.10.2010	3	6,78
	8210*	CS	krev	23.11.2010	1	90,48
D	2560	stabilní	sputum	4.2.2005	2	45,90
	3761	stabilní	sputum	2.6.2006	2	32,79
	4576	4 měsíce před CS	sputum	26.4.2007	1	87,50
E	1140	stabilní	sputum	28.5.2003	3	0
	2352	CS	sputum	14.11.2004	3	0

F	8481	stabilní	sputum	18.2.2011	3	2,33
G	1597	stabilní	sputum	14.10.2003	3	0
	7339	2 měsíce před CS	sputum	23.10.2010	1	89,47
H	1232	stabilní	sputum	16.7.2002	3	0
	8149	4 měsíce před CS	sputum	5.11.2010	2	31,03
I	576	stabilní	sputum	8.8.2002	3	0
	7272*	2 měsíce před CS	sputum	29.1.2010	3	0
	7419*	CS	krev	29.3.2010	2	33,33
J	594	stabilní	sputum	19.2.2002	3	0
	8540	CS	krev	2.3.2011	3	0
K	451	stabilní	sputum	5.3.2002	3	2,50
L	5451	stabilní	sputum	21.3.2008	3	6.67
M	1259	stabilní	sputum	1.4.2004	2	37,50
	2343	stabilní	sputum	5.11.2004	2	48,84
N	867	stabilní	sputum	1.2.2003	2	18,18
	5058	stabilní	sputum	16.10.2007	2	40,0
	8586	stabilní	sputum	11.3.2011	2	48,84

5.2.1. Práce s modelovým organismem před zahájením experimentu

Péče o dospělé jedince a embrya *Dania pruhoaného*

Dospělí jedinci *Dania pruhoaného* se udržují v 35 litrových akvariálních tancích obsahujících upravenou vodu na teplotu 27°C. Místnost, kde se akvária nachází musí být klimatizovaná, aby nedocházelo k výkyvům teploty. Životní cyklus je zajištěn osvětlováním, které je nastaveno na 14 hodin tmy a 10 hodin světla. Samice a samci se udržují zvlášť, pro účely fertilizace se populace smísí dohromady. Zjistilo se totiž, že tato separace před vlastní fertilizací, zvyšuje produkci vajíček. Aby dospělí jedinci nepožírali jikry, je nezbytné do tanku vložit polopropustnou membránu či přepážku, přes kterou se jikry dostanou do spodní části tanku (nikoliv však dospělé ryby) a jsou tímto způsobem ochráněny. Vývoj vajíček probíhá mimo akvariální tank. Vajíčka se promyjí vodou, aby se zbavila nečistot (šupin, stolice), odstraní se infikovaná vajíčka a stanoví se čas po oplodnění (hpf). Jsou-li vajíčka různého stáří, přerozdělí se do jednotlivých misek podle stáří. Další vývoj probíhá v Petriho miskách s E3 médiem v inkubátorech při teplotě 28°C. Toto médium se připravuje každý týden čerstvé. Složení E3 média v destilované vodě: 5mM chlorid sodný, 0,17mM chlorid draselný, 0,33mM chlorid vápenatý, 0,33mM síran hořečnatý a 0,00005% methylenová modř. Embrya se pravidelně kontrolují, opět se odstraní embrya infikovaná a se známkami vývojové deformace. Před mikroinjekcí se embryím pomocí kleštíček odstraní chorion (Obrázek č. 14) a podá se jim narkóza (E3 médium obsahující 0,02% tricaine, Sigma Aldrich), aby se embrya při infikování nehýbala.



Obrázek č. 14 Odstranění chorionu embrya 25 hpf (132).

Příprava bakteriální suspenze

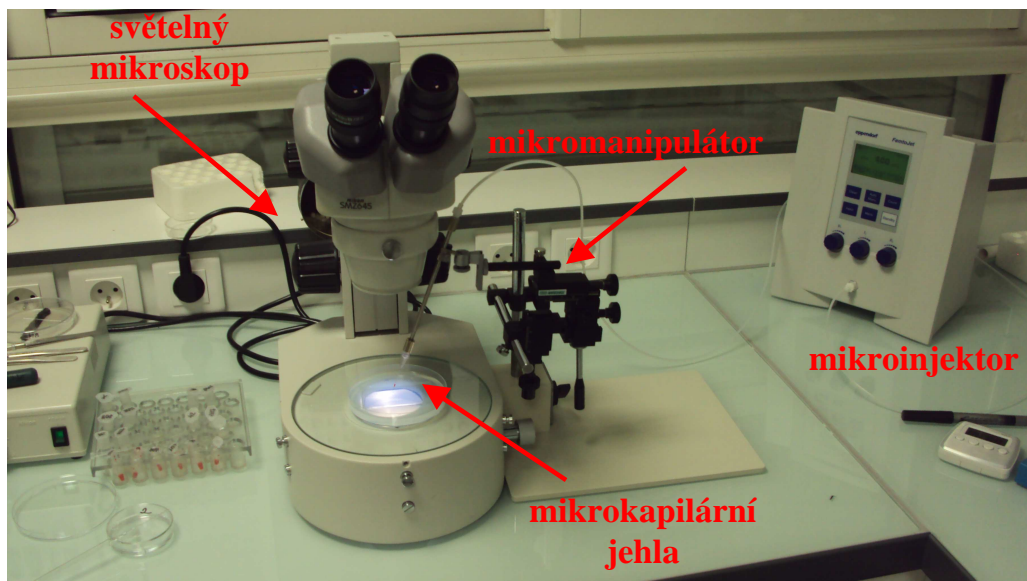
Izoláty ST32 byly kultivovány v LB bujónu přes noc při 37°C, 200 rpm. Izoláty ST32 transformované „červeným“ DSRed plazmidem pro účely Analýzy v reálném čase rostly v LB (Luria Bertani) bujónu s chloramfenikolem (100 µg/ml). Buněčná suspenze bakterií k infikování byla připravená z přes noc narostlé kultury centrifugací při 7 000 rpm, 2 min a poté resuspendovaná pomocí PBS. Požadovaná koncentrace 100 CFU/nl byla připravena v PBS pufru obsahující 0,05% fenolovou červen z důvodu vizualizace mikroinjekce.

Transformace bakteriálních buněk

Transformace plazmidu do bakteriálních buněk se provádí z bakteriální kultury narostlé přes noc v LB médiu. Dva mililitry bakteriální kultury se zcentrifugují za stálého chlazení při 7 000 rpm, 2 min. Supernatant se slije, bakteriální masa se udržuje na ledu, promyje se 1 ml HEPES roztoku. Peleta se resuspenduje a suspenze se opět v chlazené centrifuze stáčí. Tento krok se opakuje celkem 3 krát. Poté se bakterie promývají 1 ml 10% glycerolu, centrifugují se za stejných podmínek. Promývání glycerolem se provádí dohromady 2 krát. Při posledním promývání je potřeba veškerý glycerol odstranit a přidá se čerstvý glycerol o objemu 40 µl. Buňky se inkubují na ledu 20 minut. Následuje transformace buněk plazmidem pomocí elektroporace. Buňky s glycerolem se pipetou resuspendují a přepipetují se do elektroporační zkumavky. Zkumavka se vloží do elektroporátoru (MicroPulser, Bio-Rad) a vyše se krátký elektrický signál, který způsobí, že se krátký čas buňky stanou kompetentní a přijmou plazmid do buněk. K transformovaným buňkám se přidá 1 ml SOC média, lehce se pipetou směs promíchá, 1 ml suspenze se přepipetuje z elektroporační zkumavky do nové eppendorfky a udržuje se na ledu 1,5 h. Poté se buňky zcentrifugují při pokojové teplotě, 7 000 rpm, 2 min, odstraní se supernatant a přidá se 100 µl SOC média. Celá směs se vyočkuje na LB agar obsahující chloramfenikol (100 µg/ml), inkubuje se přes noc v inkubátoru. Druhý den se kontroluje, zda došlo k transformaci plazmidu pomocí UV mikroskopu. Kolonie vzniklé z transformovaných buněk svítí pod UV zářením červenou barvou. Jedna kolonie s plazmidem se rozočkuje na LB agar s chloramfenikolem. Další den se narostlá kultura zmrazí s 8% dimethylsulfoxidem.

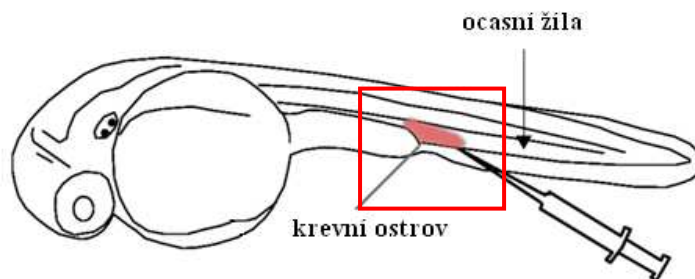
Mikroinjekce bakterií a stanovení infekční dávky

Mikroinjekce se provádí pomocí mikroinjektoru (Eppendorf), mikromanipulátoru s mikrokapilární jehlou a světelného mikroskopu (Leica MS5), Obrázek č. 15.



Obrázek č. 15 Instrumentace potřebná k mikroinjekci bakterií do embrya *Dánia* pruhovaného. Fotografie pořízena autorkou na pracovišti v Nimes.

Přibližně 1,0 – 2,0 nl bakteriální suspenze je injektováno přímo do cévního oběhu každého embrya buď v oblasti krevního ostrova, nebo axiální žíly v ocasu embrya, viz Obrázek č. 16.



Obrázek č. 16 Znáznornění místa infikování embrya v oblasti krevního ostrova. K dispozici poskytl Dr. Annette Vergunst, upraveno.

Ke stanovení infekční dávky se použije pět náhodně infikovaných embryí a zpracují se následujícím způsobem. Každé embryo se pomocí skleněné pipety přenese do 1,5 ml endorfy obsahující 50 μ l trypsinu. Embrya se rozruší pomocí pipety se žlutou špičkou pipetováním 40 krát nahoru dolů, následuje 20 minutová inkubace při pokojové teplotě. Poté se k takto mechanicky rozrušeným embryím přidá 50 μ l 2% Tritonu-X-100 a provede se další

homogenizace, tentokrát se pipetou se žlutou špičkou pipetuje celkem 20 krát nahoru a dolů. Veškerý objem se přenese na LB agar a rovnoměrně se vetře jednorázovou kličkou do agaru. LB agar obsahuje polymyxin B (100 mg/l), aby se zabránilo růstu bakteriální mikroflóry embrya. Po 18 - 24 hodinách inkubace při 37°C lze odečíst počet kolonií, které se injektovaly do embrya.

5.2.2. Analýza přežití mikroorganismu v hostiteli

Metoda je založena na infikování embryí *Dania pruhovaného* bakteriemi přímo do cévního systému. Po infekci se embrya pomocí mikroskopu kontrolují v pravidelných časových intervalech, zda mají přítomnou srdeční činnost. Ztráta srdeční činnosti je známkou úmrtí embrya. Infikovaná embrya se inkubují při 28°C v E3 médiu v 96 pozičních destičkách. Délka tohoto sledování trvá 120 hodin po infekci (hpi), poté je experiment ukončen, protože embrya po této době začínají hladovět a cítit bolest a na základě mezinárodních nařízení se v experimentu nepokračuje. Každý izolát je touto metodou testován alespoň třikrát. Výsledkem analýzy je sestavení Kaplan-Meierových křivek za pomoci softwarového programu GraphPad Prism5 (Informer Technologies). Jedním izolátem se infikuje celkem 25 embryí. Ke stanovení infekční dávky se použije pět embryí. Touto metodou jsme otestovali všech 31 izolátů *B. cenocepacia* ST32.

5.2.3. Kinetická analýza

Abychom mohli sledovat kinetiku infekce, infikovalo se přibližně 50 embryí. V časových intervalech 0, 4, 24 a 48 hpi se pět náhodně vybraných embryí zpracovalo kvůli vyčíslení CFU způsobem popsaným výše. Tato analýza se prováděla nejméně třikrát pro každý testovaný izolát. Výsledkem analýzy je kinetická křivka replikace bakterií v čase.

5.2.4. Analýza průběhu infekce v reálném čase

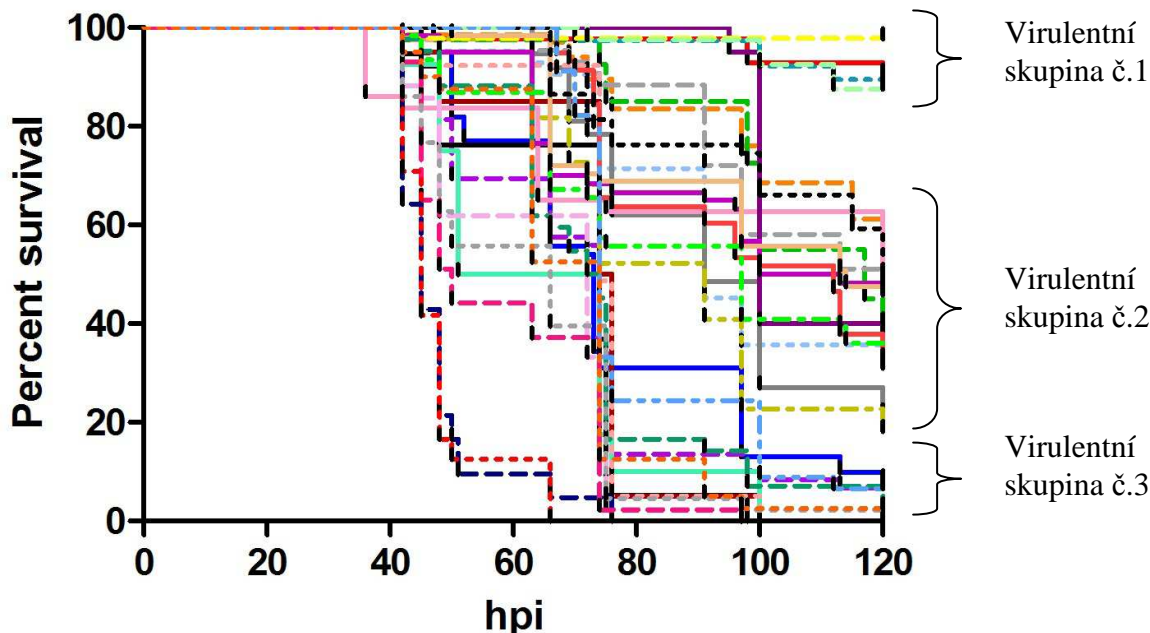
Poslední použitá metoda ke studiu virulence a zároveň nejobtížnější a časově nejnáročnější je Analýza průběhu infekce v reálném čase. K analýze se používají transgenní embrya (mpx:eGFP), jejichž neutrofily po excitování 100W rtuťové výbojky jsou pod UV mikroskopem vidět jako zelené buňky. Bakteriální izoláty jsou transformovány elektroporací plazmidem, které jsou pod UV mikroskop vidět červeně. Během experimentu se sbírají informace o průběhu infekce, pořizují se fotografie či videozáznamy reakce složek imunitního

systému hostitele a bakterií. Pro každý izolát se tyto experimenty opakoaly čtyřikrát nebo pětkrát. Analýza mikroskopem se prováděla pomocí UV mikroskopu Leica DM IRB se 100W rtuťovou výbojkou. Ke zpracování fotografií se použil program MetaVue (Molecular Devices, LLC) a poté byly upraveny pomocí programu Adobe Photoshop.

5.3. Výsledky studia virulence

5.3.1. Analýza přežití mikroorganismu v hostiteli

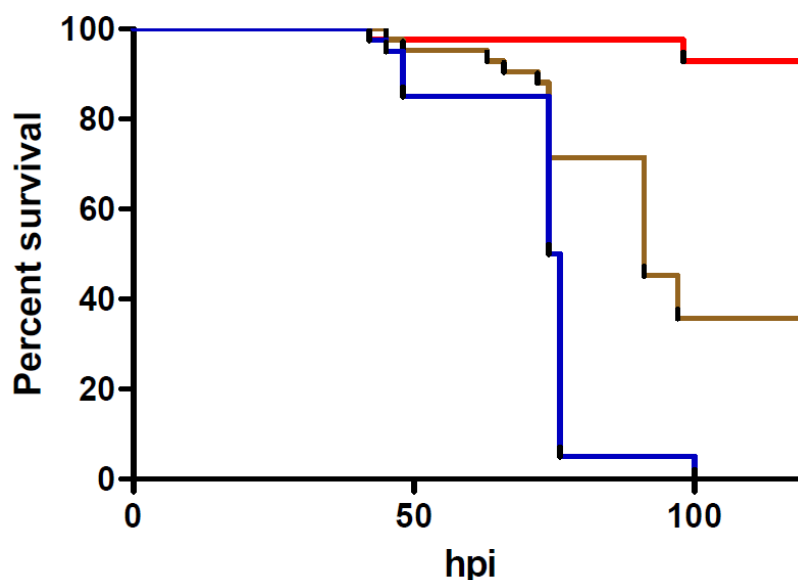
Použitím Analýzy přežití mikroorganismu v hostiteli jsme objevili významnou variabilitu virulentního potenciálu izolátů *B. cenocepacia* ST32. Infekční dávka, která byla použita k infikování embryí, se pohybovala v rozmezí od 50 do 250 CFU. S využitím programu PrismGraph jsme z našich získaných dat o počtu úmrtí infikovaných embryí sestrojili Kaplan-Meierovy křivky. Graf č. 2 zobrazuje Kaplan-Meierovy křivky všech 31 izolátů. Z tohoto grafu můžeme konstatovat, že se ST32 izoláty na základě svého virulentního potenciálu rozdělily do 3 virulentních skupin. První skupina obsahuje 4 izoláty, které byly nejméně virulentní. Izoláty z této virulentní skupiny byly schopny usmrtit pouze 2 – 13 % infikovaných embryí. Druhou skupinu tvoří izoláty se středně virulentním potenciálem. Na konci experimentu tyto izoláty byly schopny usmrtit 45 – 82 % embryí (průměr 60,9 %, medián 60,0 %, rozsah 46,2 – 81,8 %). Izolátů s touto virulencí bylo 13. Poslední skupina je tvořena 14 nejvirulentnějšími izoláty. Po 120 hpi bylo naživu 0 – 10 % infikovaných embryí, jejich úmrtnost byla 90 – 100 % (průměr 98,1 %, medián 100,0 %, rozsah 91,8 – 100 %). K 100% úmrtnosti došlo u 9 izolátů s časovým intervalem v rozsahu od 66 do 120 hpi.



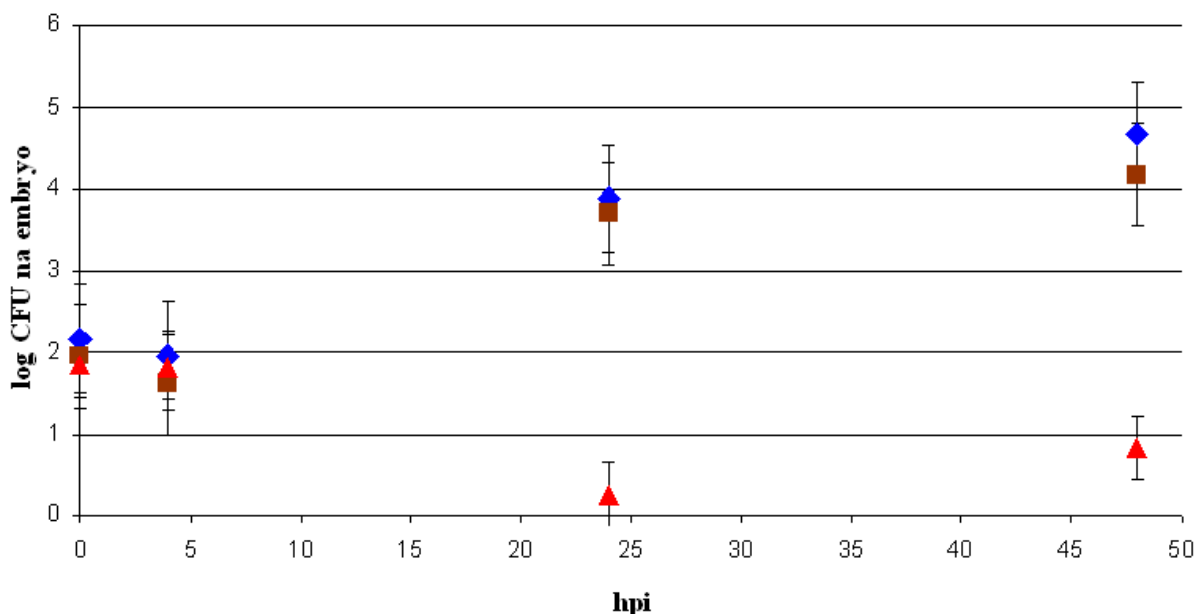
Graf č. 2 Kaplan-Meierovy křivky přežití 31 *B. cenocepacia* ST32 izolátů a jejich distribuce do virulentních skupin na základě virulentního potenciálu.

5.3.2. Kinetická analýza

Na základě výsledků ze screeningové analýzy jsme ze skupiny 31 izolátů vybrali 3 izoláty, tak aby každý reprezentoval jednoho zástupce z každé virulentní skupiny. V Grafu č. 3 jsou pro představu znázorněny Kaplan-Meierovy křivky izolátů vybraných pro následující dvě analýzy. Použili jsme párové izoláty od pacienta I. Izolát 7272 byl od tohoto pacienta izolován ze sputa 2 měsíce před cepacia syndromem. Na základě Analýzy přežití mikroorganismu v hostiteli spadá do virulentní skupiny č. 3, izolát byl schopen zabít 100 % infikovaných embryí za 100 hpi. Druhý izolát 7419 je izolát získaný z krve z cepacia syndromu. Tento izolát byl méně virulentní než předchozí izolát a díky tomu spadá do virulentní skupiny č. 2, jelikož na konci experimentu žilo 30 % infikovaných embryí. Poslední izolát určený k bližší analýze byl izolát 8210, který pocházel z krve pacienta C s cepacia syndromem. Tento izolát byl nejméně virulentním izolátem z analyzované trojice, protože byl schopen usmrtit 5 % infikovaných embryí. Infekční dávku jsme pro tuto analýzu použili 50 až 96 CFU. Na základě vyčíslení CFU bakterií v konkrétních časech po infekci jsme sestrojili křivky bakteriální replikace všech tří izolátů (Graf č. 4). Z grafu je patrné, že izoláty od pacienta I (7272 a 7419) se podobně replikují. U izolátu 8210 můžeme vidět, že se daný izolát v embryu nereplikuje, tyto bakteriální buňky jsou pravděpodobně odstraněny imunitním systémem.



Graf č. 3 Kaplan- Meierovy křivky 3 izolátů použitých pro Kinetickou analýzu a Analýzu v reálném čase. Červená křivka: izolát ID 8210, CS, krevní izolát; hnědá křivka: izolát ID 7419, CS, krevní izolát; modrá křivka: izolát ID 7272, 2 měsíce před CS, izolát ze sputa.



Graf č. 4 Bakteriální replikace izolátů 7272 (modře), 7419 (hnědě) a 8210 (červeně) v embryích Dania pruhovaného během 48 hpi. Data představují geometrické průměry se standardními chybami průměrů (n=5). Průměrné infekční dávky pro embryo byly: 146 CFU (7272), 90 CFU (7419) a 96 CFU (8210).

5.3.3. Analýza průběhu infekce v reálném čase

Všechny tři izoláty, které byly testovány předešlou metodou, byly podrobeny i Analýze průběhu infekce v reálném čase. Tato analýza je časově náročná, musí se při ní rovnoměrně popsat průběh infekce během několika dní. Protože studie ve spolupráci se spřáteleným pracovištěm stále probíhá, jsou zde popsány základní výsledky za 48 hpi. Výsledky pilotní studie se staly podkladem pro další analýzu, která vyžaduje již specializaci v oblasti interakcí hostitele s patogenem, čehož se nyní ujala Dr. Annette Vergunst.

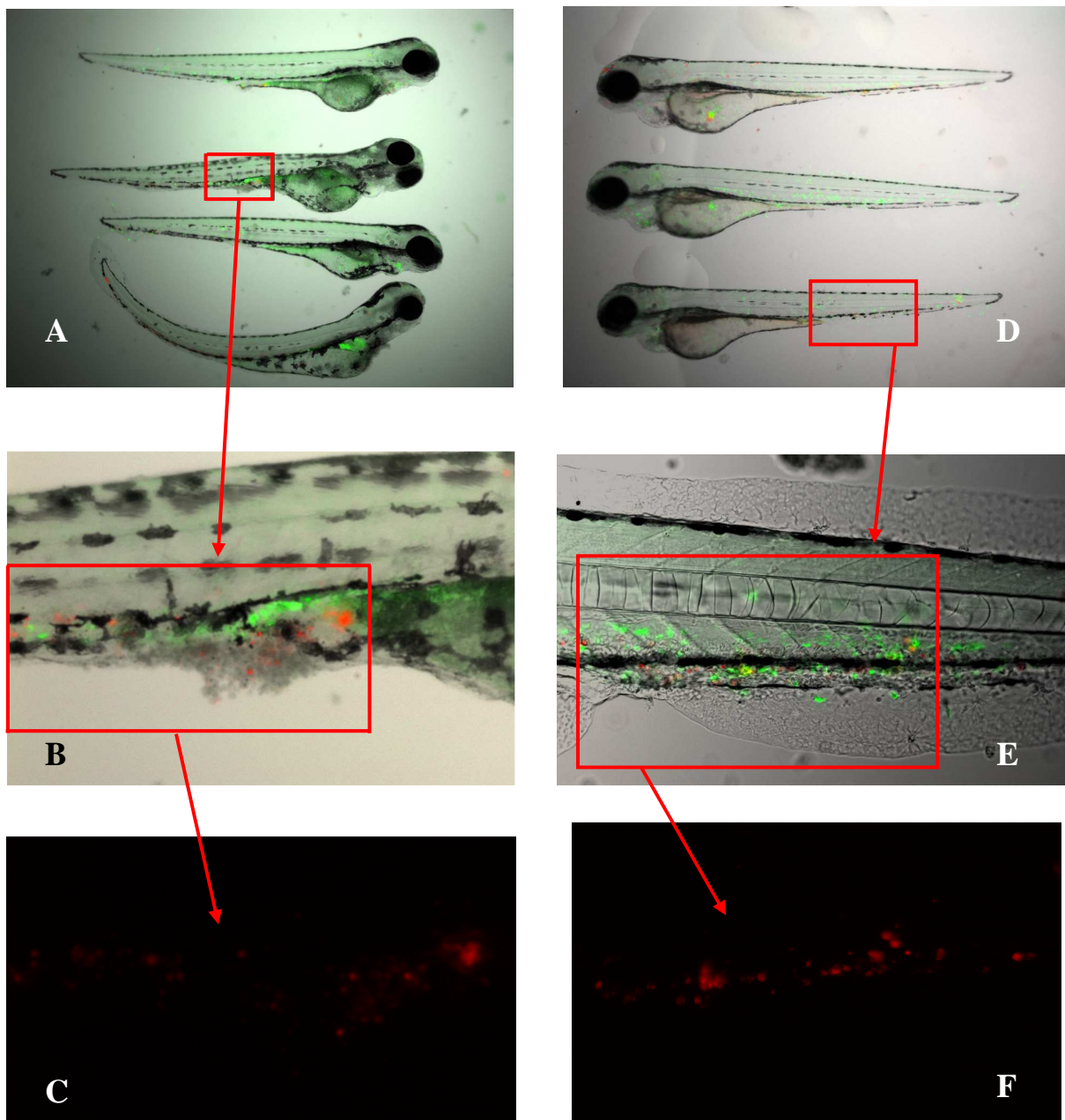
Průběh infekce u embryí infikovaných izolátem 8210 pocházejícího z cepacia syndromu můžeme popsat následovně: bezprostředně po infikování jsou bakterie přítomné v krevním oběhu, ale během 24 hpi dochází k jejich degradaci. Avšak po celou dobu sledování můžeme vidět, že několik bakterií perzistuje v tkáních embrya. Bakterie se nereplikují, což potvrzuje výsledky z kinetické analýzy. U embryí nepozorujeme známky zánětu, srdeční tep i krevní oběh jsou normální. Během dorůstání se embrya stávají aktivními - pohybují se, což vede k obtížné manipulaci při přípravě k fotografování.

Popis průběhu infekcí izolátů od pacienta I jsme shnuli do Tabulky č. 8. Domníváme se, že se čtenář snadněji zorientuje v rozdílech, které jsme během našich experimentů pozorovali. Na

Obrázku č. 17 jsou zobrazeny embrya infikovaná izoláty 7272 a 7419 po 46 hodinách od infikování.

Pozorování 22 hpi	
7272 izolát ze sputa, 2 měsíce před CS	7419 krevní izolát, CS
normální krevní oběh	normální krevní oběh
pravidelný srdeční tep	pravidelný srdeční tep
bakterie se nacházejí intracelulárně, pravděpodobně v makrofázích	málo bakterií intracelulárně, málo infikovaných makrofágů
intracelulární replikace	bakterie se nereplikují, viditelné individuální bakterie
v krevním oběhu málo bakterií	v krevním oběhu vysoký počet bakterií
Pozorování 46 hpi	
7272 izolát ze sputa, měsíc před CS	7419 krevní izolát, CS
pomalý krevní oběh	normální krevní oběh
nepřavidelný a pomalý srdeční tep	pravidelný srdeční tep
zvýšený počet bakteriálních buněk	zvýšený počet bakteriálních buněk
bakteriální buňky se nacházejí intracelulárně	bakteriální buňky se nacházejí intracelulárně
zvýšení počtu bakterií v krvi oproti 22 hpi	snížení počtu bakterií v krvi oproti 22 hpi
známky zánětu tkání	bez známek zánětu tkání
neutrofily koncentrovány v infikovaných oblastech	neutrofily rovnoměrně rozprostřeny v těle embrya

Tabulka č. 8 Shrnutí rozdílů průběhu infekce pozorovaných u izolátů 7272 a 7419 v čase 22 a 46 hpi.
CS cepacia syndrom



Obrázek č. 17 Analýza infekce v reálném čase způsobená izoláty 7272 a 7419 od pacienta I v čase 46 hpi. **A)** Čtyři embrya infikována izolátem 7272, zvětšení 2x, zakreslená oblast znázorňuje část ocasu na dalších fotografiích. **B)** Část ocasu embrya infikovaného izolátem 7272, zvětšeno 4x, zakreslená oblast znázorňuje zánět tkáně. **C)** Ocas embrya z obrázku B, červeně intracelulárně se replikující bakterie. **D)** Embrya infikována izolátem 7419, zvětšení 2x. **E)** Zvětšená část ocasu embrya z obrázku D, tkáň bez známek zánětu, zvětšeno 4x. **F)** Ocas embrya z obrázku E, červeně replikující se bakterie.

5.4. Diskuze

Pomocí zvířecího modelu jsme prokázali variabilitu ve virulenci izolátů pocházejících od různých pacientů z různých fází infekce. Potvrdili jsme hypotézu, že různé průběhy infekcí, které pozorujeme u našich pacientů, nejsou zapříčiněny jen charakteristikou pacienta, ale určitý podíl nese i patogen, který infekci způsobuje. Provedením podrobnějších analýz zaměřených na chování bakterií uvnitř hostitele jsme nedostali odpověď na otázku, čím jsou jednotlivé rozdíly způsobeny. Naopak tyto experimenty otevřely prostor pro další otázky. Popsali jsme kinetiku infekce a chování dvou izolátů od jednoho pacienta lišící se od sebe dva měsíce a místem izolace. Jejich kinetika replikace je totožná, avšak každý z nich má jiný efekt infekce na zvířecí model, způsobuje jiný obraz infekce. Čím je to způsobené? Proč se krevní izolát z cepacia syndromu zdržuje v krevním oběhu déle, zatímco izolát ze sputa je již fagocytován a replikuje se v tkáních v čase 22 hpi? Může se izolát z cepacia syndromu replikovat extracelulárně? Zdá se, že izoláty se replikují stejně, ale postup infekce je u izolátu z cepacia syndromu opožděn. Proč, to nevíme. Jasno do toho nevnesl ani další krevní izolát od jiného pacienta z cepacia syndromu. Tento izolát je nevirulentní, což potvrzuje i kinetická analýza a v reálném čase jsme pozorovali odstranění většiny bakterií imunitním systémem, ačkoliv několik bakterií zde perzistuje, ovšem bez známek replikace.

Souhrnné výsledky z této studie modelového organismu v podobě původního článku se připravují, a proto nejsou součástí této dizertační práce. Podaří-li se nám tato práce odpublikovat, budeme první, kdo provedl tak rozsáhlou studii virulence jednoho kmene na tak velkém počtu izolátů z různých fází infekce.

6. PLICNÍ MIKROBIOM U PACIENTŮ S CYSTICKOU FIBRÓZOU

Cíl: Studium mikrobiální diverzity plicního mikrobiomu.

Důvod: Chtěli jsme zjistit, zda se liší mikrobiální diverzita ve skupině pacientů s různým typem chronické infekce.

Následující kapitola se již nevěnuje problematice epidemického kmene, ale studiu plicního mikrobiomu. Jak již bylo známo v Obecné části této práce, s rozvojem kultivačně nezávislých metod došlo k přehodnocení složení plicního mikrobiomu u pacientů s CF. Bylo zjištěno, že v plicích těchto pacientů se nacházejí nejen aerobní či obligátně aerobních bakterie, ale i anaerobní bakterie. Nejnovější studie věnované problematice mikrobiomu u CF přicházejí se zjištěním, že s vyšším věkem pacientů dochází ke snižování bakteriální diverzity v plicním mikrobiomu (134),(135). Náš tým společně se zahraničními kolegy z CCF v Manchesteru a Univerzity v Cardiffu se zaměřil na několik skupin pacientů s CF podle typu jejich infekce a provedli jsme analýzu diverzity plicního mikrobiomu pomocí analýzy ribozomálního mezigenového prostoru (RISA), jejíž princip je vysvětlen v Obecné části v kapitole Typizace bakterií.

6.1. Metodika studia plicního mikrobiomu

Vybrané skupiny pacientů podle jejich infekce

Ke studiu plicního mikrobiomu jsme vybrali pacienty podle typu infekce a jejich vzorky sput jsme podrobili analýze metodou RISA. Celkem bylo testováno 5 skupin. První skupina (i) představovala pacienty s chronickou infekcí *B. cenocepacia* ST32. Otestovali jsme 13 pacientů s touto infekcí, u dvou z nich jsme provedli longitudinální analýzu. Vyšetřili jsme od každého šest vzorků za období od roku 2002 až 2010. Třináct vzorků sput od 13 pacientů tvořilo druhou skupinu (ii). Ti měli chronickou infekci Bcc, ale způsobenou jinými kmeny než ST32. Dále jsme testovali složení mikrobiomu u dvanácti pacientů, kteří měli chronickou infekci způsobenou PA (iii). Další skupinu (iv) tvořili pacienti s chronickou infekcí PA a ST32. Jednalo se o 11 pacientů. Poslední skupina (v) obsahovala pacienty bez PA i Bcc infekce. Analýze jsme podrobili vzorky DNA extrahované z klinických vzorků, které pocházely z naší sbírky DNA, které LMG Pediatrické kliniky a ÚLM sbírá od roku 2001.

Extrakce DNA

DNA ze všech vzorků byla vyextrahována pomocí komerčně dodávaného kitu určeného pro vzorky sput AmpliCor Respiratory Specimen Extraction kit (Roche) podle doporučeného postupu výrobce.

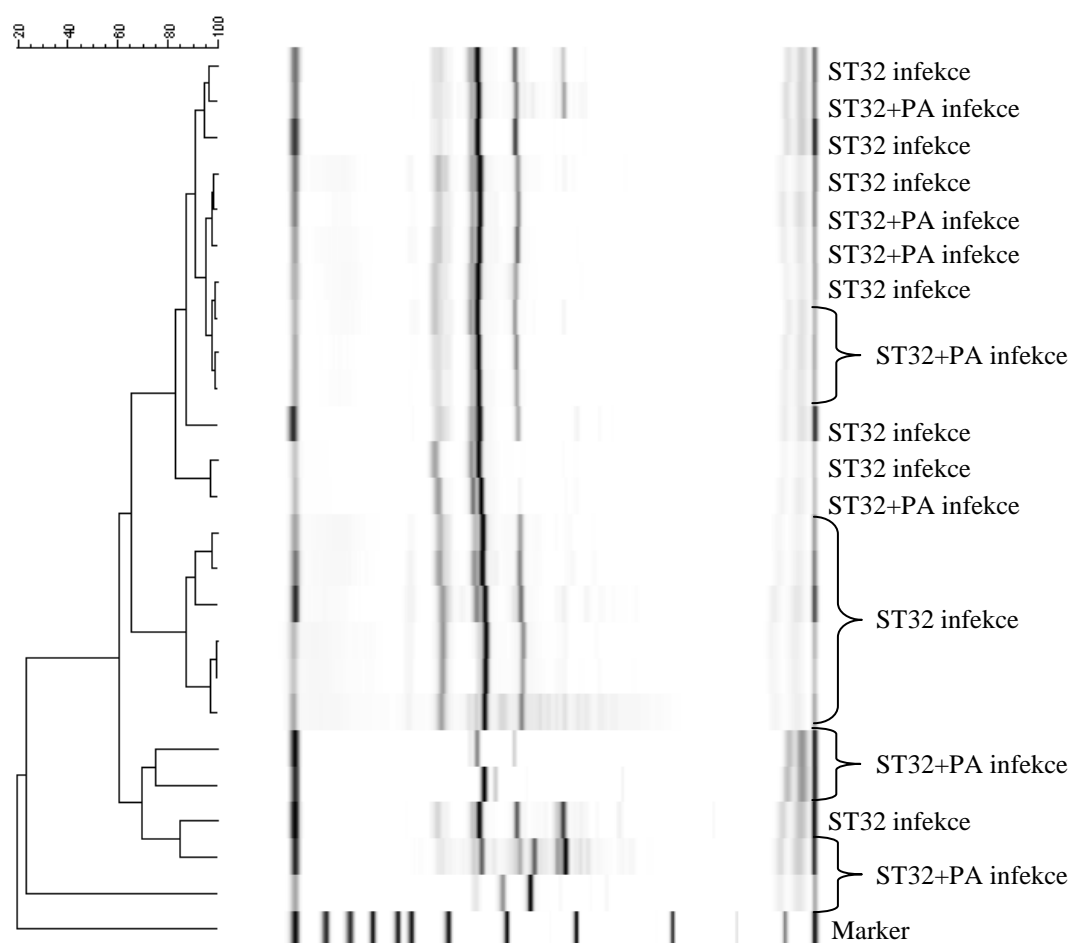
RISA

Vycházeli jsme z již publikovaného postupu (107). Ve stručnosti PCR mix o celkovém objemu 20 µl s 1 µl DNA obsahoval: 1 x PCR pufr, 1 x Q-solution, 0,2mM dNTPs každý, 1,6µM primer 1406F (5'-TGYACACACCGCCCGT-3') a 1,6µM 23SR primer (5'-GGGTTBCCCCATTCRG-3'), chemikálie z kitu *Taq* PCR Core (Qiagen). PCR program byl složen z počáteční denaturace 95°C, 5 min; následovalo 35 cyklů složených z denaturace 95°C, 30 sec; nasednutí primerů 55°C, 30 sec a syntézy 72°C, 1 min a finální syntézy 72°C, 5 min. PCR produkty byly separovány pomocí elektroforézy na čipu Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent). K porovnání jednotlivých RISA profilů se použil software BioNumerics (Applied Maths).

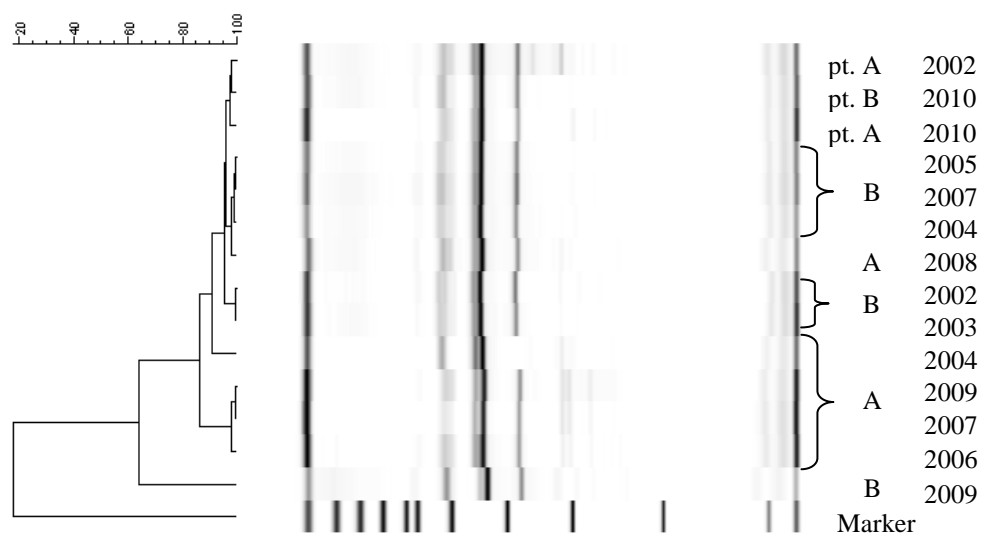
6.2. Výsledky

Na základě provedené shlukové analýzy v programu BioNumerics jsme zjistili, že vzorky sput od chronicky infikovaných pacientů kmenem ST32 (i), které byly podrobeny analýze RISA vytvářejí robustní klastr Obrázek č. 18. Překvapivě jsme pozorovali stejný fingerprintový profil i u skupiny pacientů (iv), tedy u chronicky infikovaných pacientů s infekcí *B. cenocepacia* ST32 a PA. Na Obrázku č. 18 je ukázáno, že profily od pacientů ze skupiny (iv) mají téměř stejnou podobnost se vzorky ze skupiny (i) až na 4 výjimky. V longitudinálním sledování dvou pacientů chronicky infikovaných *B. cenocepacia* ST32, od kterých jsme otestovali 6 vzorků sput v časovém rozpětí 9 let, jsme zjistili opět identické profily Obrázek č. 19. U ostatních skupin (ii, iii a v) jsme nezaznamenali žádný převládající fingerprintový profil pro některou ze skupin. Obecně lze říci, že u těchto skupin se vyskytuje mikrobiální diverzita Obrázek č. 20. CCF v Manchesteru a Univerzita v Cardiffu našla u svých pacientů infikovaných kmeny z epidemické linie ET12 stejný dominantní profil, ostatní mikroflóra zde nebyla pozorována. U pacientů infikovaných nefermentujícími gramnegativními bakteriemi (*Achromobacter xylosoxidans*, *Stenotrophomonas maltophilia* či *Ralstonia mannitolilytica*) se vytvořily unikátní profily s nízkou bakteriální diverzitou. U vzorků s PA je patrná vyšší mikrobiální diverzita a provedením clusterové analýzy vzorky s PA vytvářejí samostatnou

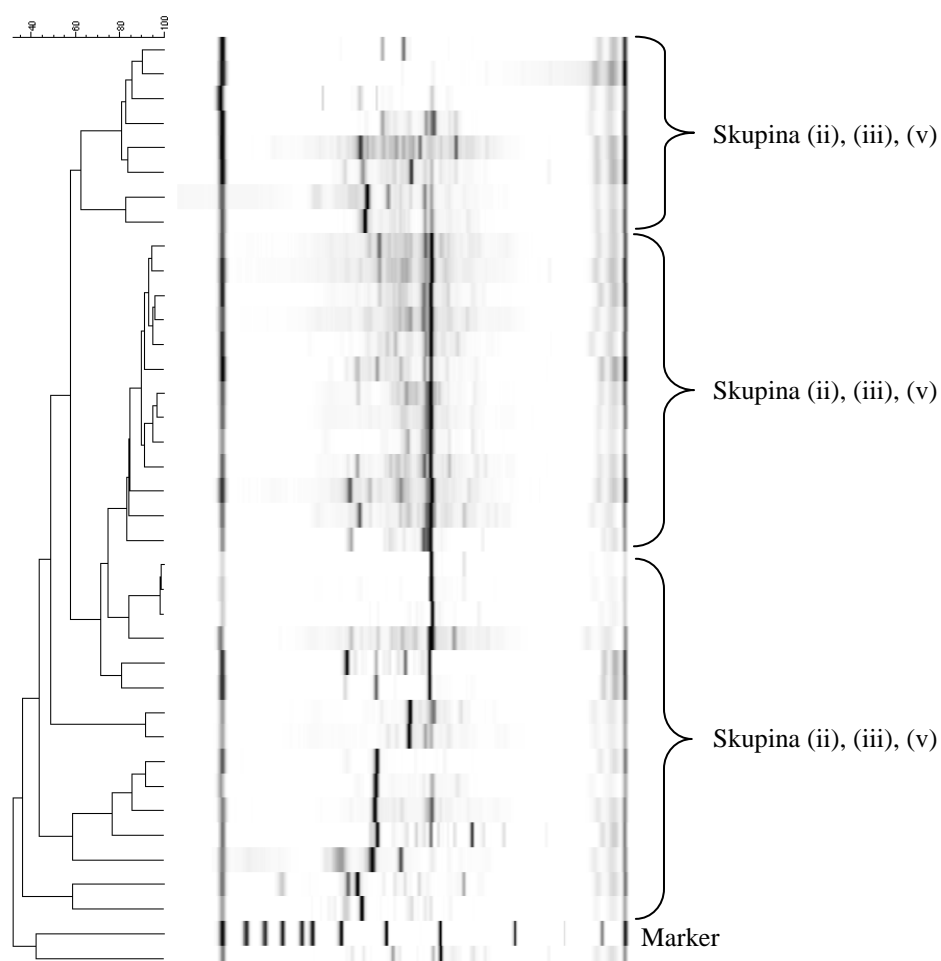
skupinu Obrázek č. 21. Obrázek č. 21 byl poskytnut E. Mahenthiralingem ze spolupracujícího pracoviště v Cardiffu.



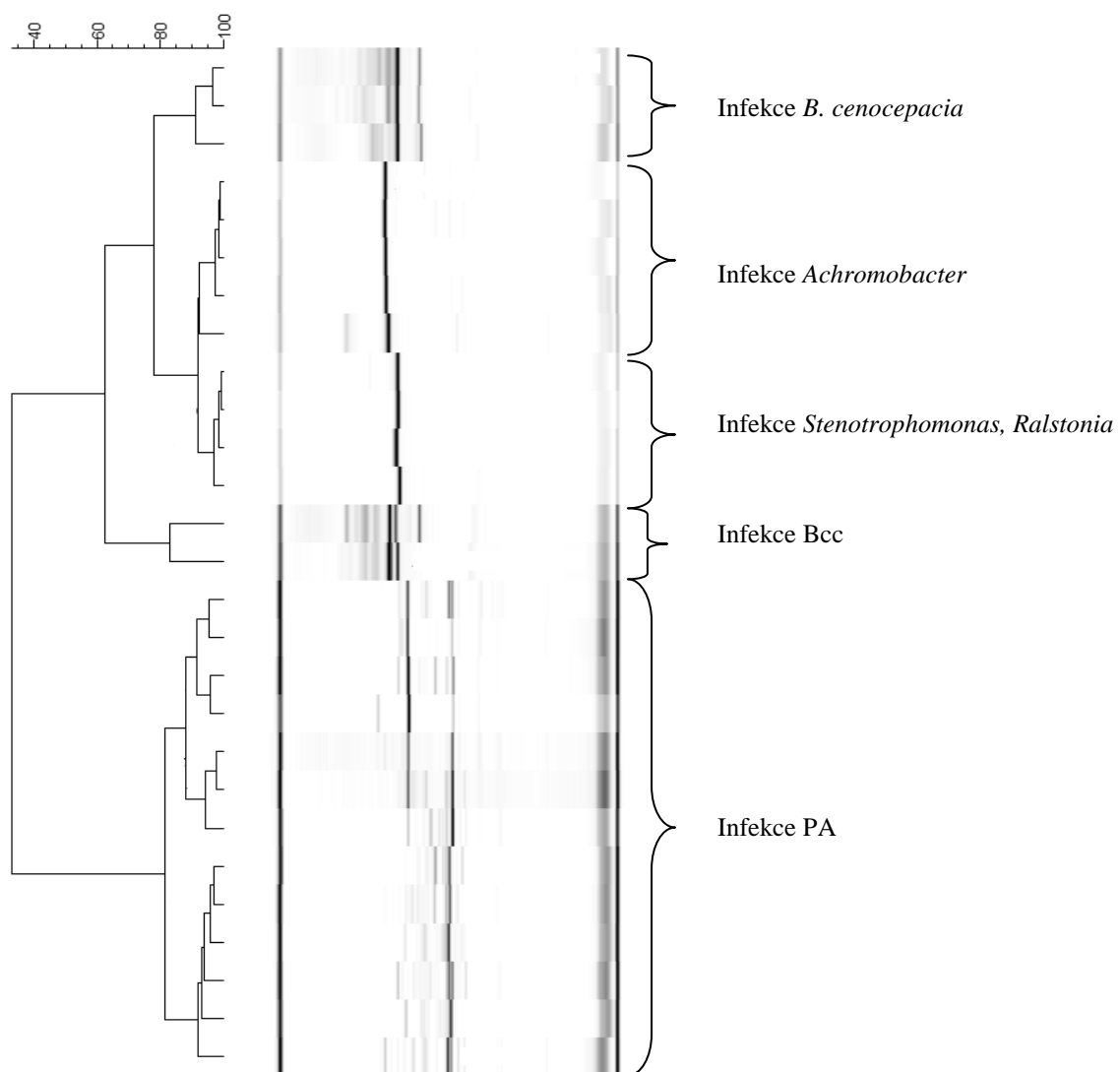
Obrázek č. 18 Shluková analýza RISA profilů vzorků sput od pacientů ze skupiny (i) a (iv).



Obrázek č. 19 Analýza metodou RISA longitudinálních vzorků sputa od 2 pacientů (pacient A a B) chronicky infikovaných *B. cenocepacia* ST32. První sloupeček v legendě uvádí pacienta, druhý sloupeček znázorňuje rok, kdy byl vzorek sputa od pacienta získán.



Obrázek č. 20 Shluková analýza vyšetřených vzorků sputa ze skupin (ii), (iii) a (v) vyšetřených analýzou RISA.



Obrázek č. 21 RISA analýza vzorků sput od pacientů z CCF v Manchesteru.

6.3. Diskuze

Analýza ribozomálního mezigenového prostoru mezi geny 16S a 23S rRNA se osvědčila jako užitečná metoda rychlého screeningu mikrobiální diverzity plicního mikrobiomu u pacientů s cystickou fibrózou. Díky provedené studii jsme zjistili, že u chronicky infikovaných pacientů kmenem *B. cenocepacia* ST32 je výrazně snižena mikrobiální diverzita, stejně jako u superinfekce s PA. V longitudinálním sledování jsme použili nejstarší dochované vzorky sput z roku 2002. U pacienta B se jednalo o čtvrtý rok infekce, u pacienta A sedmý rok. Můžeme tedy předpokládat, že k ustanovení nízké mikrobiální diverzity dochází během prvních let infekce. U vzorků od pacientů infikovaných jiným kmenem než *B. cenocepacia* ST32 v rámci Bcc došlo k vytvoření RISA profilů se zvýšenou diverzitou. Spolupracující CCF v Manchesteru se stará o pacienty, kteří mají chronickou infekci jinými nefermentujícími gramnegativními bakteriemi. I u těchto pacientů došlo k vytvoření unikátních RISA profilů s nízkou mírou diverzity oproti pacientům infikovaných PA. Můžeme tedy konstatovat, že Bcc, *Achromobacter xylosoxidans*, *Stenotrophomonas maltophilia* či *Ralstonia mannitolilytica* způsobují snížení mikrobiální diverzity u pacientů s CF.

7. DALŠÍ SMĚRY VÝZKUMU

Dizertační práce se zabývala problematikou nejzávažnějších bakterií pro pacienty s cystickou fibrózou - bakteriemi komplexu *Burkholderia cepacia*. Snažili jsme se na tyto patogeny podívat z několika různých úhlů. První z nich se zabýval nejúčinnější diagnostikou a na ní navazující problematikou vhodné typizace. V této oblasti se další směr výzkumu bude ubírat typizací pomocí alternativních metod dosud používaných přístupů. Hlavní význam nových technologií by spočíval v úspoře času, který by byl potřebný k určení kmenové příslušnosti, ale také v úspoře finanční. Takovou metodou by mohla být například typizace pomocí MALDI-TOF.

V oblasti epidemiologie bude naše hlavní role spočívat v neustálém monitorování epidemiologické situace a ve včasné reakci v případě epidemického šíření. V této problematice se vědecké týmy budou věnovat studiu vhodného markeru či vhodných markerů, které by jednoznačně charakterizovaly přenosnost kmene. Stanovení těchto markerů by v budoucnosti mohlo zmírnit separační systém mezi pacienty s CF. Oddělovali by se pouze pacienti infikovaní kmeny přenosnými. Toto by zjednodušilo organizaci ambulantních návštěv a hospitalizací v centrech cystické fibrózy.

Na základě výsledků ze studia virulence izolátů *B. cenocepacia* ST32 na modelovém organismu vyplývají dvě úrovně dalšího výzkumu. První z nich je studium genové exprese izolátů z různých fází infekce, zejména pak z terminální fáze. To by umožnilo určit geny, které bakterie využívají pro daný okamžik infekce. Pomocí cílené mutageneze by se dalo zjistit, zda tyto geny mají vliv na změnu jejich virulence, tudíž jestli se tedy uplatňují tyto geny v průběhu infekce. Produkty těchto genů by se mohly stát dalšími cíli ve výzkumu, například ve výzkumu nových antibakteriálních látek. Druhá úroveň výzkumu spočívá v úplném pochopení interakce bakterií s hostitelským imunitním systémem, pochopení zda Bcc ke svému množení uvnitř hostitele využívají některé konkrétní buňky, například fagocyty nebo zda se replikují extracelulárně.

V oblasti plicního mikrobiomu se naše pozornost zaměřuje na studium patogenů, které ovlivňují rozvoj plicních exacerbací u pacientů s cystickou fibrózou. Nezodpovězenou otázkou, která nás v této problematice trápí je: Jaké patogeny zasahujeme antibiotickou léčbou, kterou podáme pacientovi na základě stanovení diagnózy plicní exacerbace? Setkáváme se totiž se situací, že po podání antibiotické léčby dochází ke zlepšení stavu pacienta, ale patogen, vůči kterému byla léčba podána, je v plicích pacienta stále přítomen. Domníváme se, že v mikrobiomu našich pacientů pravděpodobně existují mikroorganismy,

které se přímo podílejí na rozvoji exacerbace. Za pomoci sekvenování nové generace chceme zjistit, které patogeny jsou nejvíce ovlivněny podáním léčby. Dále chceme popsat další nové patogeny v mikrobiomu pacientů s CF, které jsou obtížně kultivovatelné.

8. ZÁVĚR

Předkládaná dizertační práce navazuje na studii Doc. MUDr. Pavla Dřevínka, Ph.D., která byla započata v roce 2001. Tato práce začíná zhodnocením užitečnosti molekulárně genetické diagnostiky *recA* PCR určené k detekci bakterií komplexu *Burkholderia cepacia*, kterou právě Doc. Dřevínek zaváděl v roce 2001 do rutinního provozu v LMG Pediatrické kliniky a ÚLM. Ve své době bylo cílem zavedení této metody zvýšení citlivosti detekce a identifikace druhové příslušnosti bakterií komplexu *Burkholderia cepacia*. Každá nová metoda zavedená do rutinního provozu potřebuje určitý čas ke zhodnocení svého významu. My jsme k tomu přistoupili téměř deset let od jejího zavedení a v této práci jsme potvrdili její nezastupitelnou roli. U 31 % případů nových infekcí právě *recA* PCR detekovala přítomnost Bcc jako první.

Pomocí molekulárně genetických metod typizace jsme popsali druhové a kmenové složení populace našich pacientů infikovaných Bcc a zjistili jsme, že se v našem Centru cystické fibrózy ve Fakultní nemocnici v Motole již nešíří epidemický kmen *B. cenocepacia* ST32.

Společně se specifickou detekcí epidemického kmene za pomoci genotypizačních metod jsme zavedli dva podsystemy určené k monitorování stavu infekcí Bcc v našem centru, které by měly fungovat v prevenci šíření infekce.

Pomocí genomické subtraktivní hybridizace a studia infekce *B. cenocepacia* ST32 pomocí zvířecího modelu jsme přispěli k bližšímu poznání epidemického kmene z hlediska virulence, faktorů virulence a genomové plasticity. Popsali jsme, že u chronicky infikovaných pacientů s epidemickým kmenem dochází během prvních tří let ke snížení mikrobiální diverzity ve prospěch epidemického kmene.

V budoucnosti se poznatky získané na základě této dizertační práce stanou základem pro studium genové exprese, markerů transmisivity a interakcí hostitelského imunitního systému s patogenem.

9. LITERATURA

1. Wine JJ. The genesis of cystic fibrosis lung disease. *J Clin Invest.* 1999 Feb;103(3):309-12.
2. Boucher RC. Cystic fibrosis: a disease of vulnerability to airway surface dehydration. *Trends Mol Med.* 2007 Jun;13(6):(23):1-40.
3. Krulišová V, Balaščáková M, Skalická V et al. Prospective and parallel assessments of cystic fibrosis newborn screening protocols in the Czech Republic: IRT/DNA/IRT versus IRT/PAP and IRT/PAP/DNA. *Eur J Pediatr* 2012;Aug;171(8):1223-9.
4. Křenková P, Piskáčková T, Holubová A et al. Distribution of CFTR mutations in the Czech population: Positive impact of integrated clinical and laboratory expertise, detection of novel/de novo alleles and relevance for related/derived populations. *J Cyst Fibros* 2013 Sep;12(5):532-7.
5. Lipuma JJ. The changing microbial epidemiology in cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev.* 2010 Apr;23(2):299-323.
6. Rogers GB, Carroll MP, Serisier DJ et al. Characterization of bacterial community diversity in cystic fibrosis lung infections by use of 16s ribosomal DNA terminal restriction fragment length polymorphism profiling. *J Clin Microbiol.* 2004 Nov;42(11):5176-83.
7. van der Gast CJ, Walker AW, Stressmann FA et al. Partitioning core and satellite taxa from within cystic fibrosis lung bacterial communities. *ISME J* 2011 May;5(5):780-91.
8. Tunney MM, Field TR, Moriarty TF et al. Detection of anaerobic bacteria in high numbers in sputum from patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;May 1;177(9):995-1001.
9. Mahenthiralingam E, Urban TA, Goldberg JB. The multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia* complex. *Nat Rev Microbiol.* 2005 Feb;3(2):144-56.
10. Burkholder WH. Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. *Phytopathology.* 1950;40:115-7.
11. Cheng HP, G. LT. Multiple replicons constituting the genome of *Pseudomonas cepacia* 17616. *J Bacteriol* 1994;176:4034-42.
12. Rodley PD, Romling U, Tummler B. A physical genome map of the *Burkholderia cepacia* type strain. *Mol Microbiol* 1995;17:57-67.
13. Yabuuchi E, Kosako Y, Oyaizu H et al. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbiol Immunol.* 1992;36(12):1251-75.
14. Vandamme P, Holmes B, Vancanneyt M et al. Occurrence of multiple genomovars of *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis patients and proposal of *Burkholderia multivorans* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 1997;47(4):1188-200.
15. Coenye T, Mahenthiralingam E, Henry D et al. *Burkholderia ambifaria* sp. nov., a novel member of the *Burkholderia cepacia* complex including biocontrol and cystic fibrosis-related isolates. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2001;51(Pt 4):1481-90.
16. Vandamme P, Mahenthiralingam E, Holmes B et al. Identification and population structure of *Burkholderia stabilis* sp. nov. (formerly *Burkholderia cepacia* genomovar IV). *J Clin Microbiol.* 2000;38(3):1042-7.
17. Vandamme P, Henry D, Coenye T et al. *Burkholderia anthina* sp. nov. and *Burkholderia pyrrocinia*, two additional *Burkholderia cepacia* complex bacteria, may confound results

- of new molecular diagnostic tools. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2002 Jun 3;33(2):143-9.
18. Vandamme P, Holmes B, Coenye T et al. *Burkholderia cenocepacia* sp. nov. - a new twist to an old story. *Res Microbiol*. 2003;154(2):91-6.
 19. Payne GW, Ramette A, Rose HL et al. Application of a *recA* gene-based identification approach to the maize rhizosphere reveals novel diversity in *Burkholderia* species. *FEMS Microbiol Lett*. 2006 Jun;259(1):126-32.
 20. Baldwin A, Mahenthiralingam E, Thickett KM, Honeybourne D, Maiden MC, Govan JR, et al. Multilocus sequence typing scheme that provides both species and strain differentiation for the *Burkholderia cepacia* complex. *J Clin Microbiol*. 2005 Sep;43(9):4665-73.
 21. Dalmastri C, Baldwin A, Tabacchioni S et al. Investigating *Burkholderia cepacia* complex populations recovered from Italian maize rhizosphere by multilocus sequence typing. *Environ Microbiol*. 2007 Jul;9(7):1632-9.
 22. Vandamme P, Dawyndt P. Classification and identification of the *Burkholderia cepacia* complex: Past, present and future. *Syst Appl Microbiol* 2011 Apr;34(2):87-95.
 23. Alexander BD, Petzold EW, Reller LB et al. Survival after lung transplantation of cystic fibrosis patients infected with *Burkholderia cepacia* complex. *Am J Transplant*. 2008 May;8(5):1025-30.
 24. Bartáková LV, Fila L, Adámek S et al. Lung transplantation in cystic fibrosis patients in the Czech Republic: initial single-center experience. *Transplant Proc* 2010 Nov;42(9):3711-3.
 25. Govan JR, Brown PH, Maddison J et al. Evidence for transmission of *Pseudomonas cepacia* by social contact in cystic fibrosis. *Lancet*. 1993;342(8862):15-9.
 26. Pegues DA, Carson LA, Tablan OC et al. Acquisition of *Pseudomonas cepacia* at summer camps for patients with cystic fibrosis. Summer Camp Study Group. *J Pediatr*. 1994;124(5 Pt 1):694-702.
 27. LiPuma JJ, Dasen SE, Nielson DW, Stern RC, Stull TL. Person-to-person transmission of *Pseudomonas cepacia* between patients with cystic fibrosis. *Lancet*. 1990;336(8723):1094-6.
 28. Hutchinson GR, Parker S, Pryor JA et al. Home-use nebulizers: a potential primary source of *Burkholderia cepacia* and other colistin-resistant, gram-negative bacteria in patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 1996 Mar;34(3):584-7.
 29. Alvarez-Lerma F, Maull E, Terradas R et al. Moisturizing body milk as a reservoir of *Burkholderia cepacia*: outbreak of nosocomial infection in a multidisciplinary intensive care unit. *Crit Care*. 2008; 12(1).
 30. Jones AM, Dodd ME, Govan JR et al. *Burkholderia cenocepacia* and *Burkholderia multivorans*: influence on survival in cystic fibrosis. *Thorax*. 2004 Nov;59(11):948-51.
 31. Mahenthiralingam E, Vandamme P, Campbell ME et al. Infection with *Burkholderia cepacia* Complex Genomovars in Patients with Cystic Fibrosis: Virulent Transmissible Strains of Genomovar III Can Replace *Burkholderia multivorans*. *Clin Infect Dis*. 2001;33(9):1469-75.
 32. Coutinho CP, Dos Santos SC, Madeira A et al. Long-term colonization of the cystic fibrosis lung by *Burkholderia cepacia* complex bacteria: epidemiology, clonal variation, and genome-wide expression alterations. *Front Cell Infect Microbiol* 2011;1:12.
 33. Isles A, Macluskay I, Corey M et al. *Pseudomonas cepacia* infection in cystic fibrosis: an emerging problem. *J Pediatr*. 1984;104(2):206-10.
 34. UK CF Registry Annual Data Report 2008. Bromley UCF, 2009.
 35. Manno G, Dalmastri C, Tabacchioni S et al. Epidemiology and clinical course of *Burkholderia cepacia* complex infections, particularly those caused by different

- Burkholderia cenocepacia strains, among patients attending an Italian Cystic Fibrosis Center. J Clin Microbiol. 2004 Apr;42(4):1491-7.
36. Cunha MV, Leitao JH, Mahenthiralingam E et al. Molecular analysis of Burkholderia cepacia complex isolates from a Portuguese cystic fibrosis center: a 7-year study. J Clin Microbiol. 2003 Sep;41(9):4113-20.
 37. Speert DP, Henry D, Vandamme P et al. Epidemiology of Burkholderia cepacia Complex in Patients with Cystic Fibrosis, Canada. Emerg Infect Dis. 2002;8(2):181-7.
 38. Brisse S, Cordevant C, Vandamme P et al. Species distribution and ribotype diversity of Burkholderia cepacia complex isolates from French patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol. 2004 Oct;42(10):4824-7.
 39. Kidd TJ, Douglas JM, Bergh HA et al.. Burkholderia cepacia complex epidemiology in persons with cystic fibrosis from Australia and New Zealand. Res Microbiol 2008;Apr;159(3):194-9.
 40. Kalish LA, Waltz DA, Dovey M et al. Impact of Burkholderia dolosa on lung function and survival in cystic fibrosis. Am J Respir Crit Care Med 2006 Feb 15;173(4):421-5.
 41. Vanlaere E, Baldwin A, Gevers D et al. Taxon K, a complex within the Burkholderia cepacia complex, comprises at least two novel species, Burkholderia contaminans sp. nov. and Burkholderia lata sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2009 Jan;59(Pt 1):102-11.
 42. Medina-Pascual M, Valdezate S, Villalón P et al. Identification, molecular characterisation and antimicrobial susceptibility of genomovars of the Burkholderia cepacia complex in Spain. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2012 Dec;31(12):3385-96.
 43. Campana S, Taccetti G, Ravenni N et al. Transmission of Burkholderia cepacia complex: evidence for new epidemic clones infecting cystic fibrosis patients in Italy. J Clin Microbiol 2005; Oct;43(10):5136-42.
 44. Nørskov-Lauritsen N, Johansen HK, Fenger MG et al. Unusual Distribution of Burkholderia cepacia Complex Species in Danish Cystic Fibrosis Clinics May Stem from Restricted Transmission between Patients. J Clin Microbiol 2010 Aug;48(8):2981-3.
 45. Pope CE, Short P, Carter PE. Species distribution of Burkholderia cepacia complex isolates in cystic fibrosis and non-cystic fibrosis patients in New Zealand. J Cyst Fibros 2010 Dec;9(6):442-6.
 46. Baldwin A, Sokol PA, Parkhill J et al. The Burkholderia cepacia epidemic strain marker is part of a novel genomic island encoding both virulence and metabolism-associated genes in Burkholderia cenocepacia. Infect Immun. 2004 Mar;72(3):1537-47.
 47. Johnson WM, Tyler SD, Rozee KR. Linkage analysis of geographic and clinical clusters in Pseudomonas cepacia infections by multilocus enzyme electrophoresis and ribotyping. J Clin Microbiol. 1994;32(4):924-30.
 48. Baldwin A, Mahenthiralingam E, Drevinek P et al. Elucidating global epidemiology of Burkholderia multivorans in cases of cystic fibrosis by multilocus sequence typing. J Clin Microbiol. 2008 Jan;46(1):290-5.
 49. Chen JS, Witzmann KA, Spilker T et al. Endemicity and inter-city spread of Burkholderia cepacia genomovar III in cystic fibrosis. J Pediatr. 2001;139(5):643-9.
 50. Coenye T, Spilker T, Van Schoor A et al. Recovery of Burkholderia cenocepacia strain PHDC from cystic fibrosis patients in Europe. Thorax. 2004 Nov;59(11):952-4.
 51. Kumar A, Dietrich S, Schneider W et al. Genetic relatedness of Burkholderia (Pseudomonas) cepacia isolates from five cystic fibrosis centers in Michigan. RESPIR MED. 1997;91:485-492.
 52. Segonds C, Bingen E, Couetdic G et al. Genotypic analysis of Burkholderia cepacia isolates from 13 French cystic fibrosis centers. J Clin Microbiol 1997 Aug;35(8):2055-60.

53. Whiteford ML, Wilkinson JD, McColl JH et al. Outcome of *Burkholderia* (*Pseudomonas*) *cepacia* colonisation in children with cystic fibrosis following a hospital outbreak. *Thorax*. 1995 Nov;50(11):1194-8.
54. Coenye T, LiPuma JJ, Henry D. et al. *Burkholderia cepacia* genomovar VI, a new member of the *Burkholderia cepacia* complex isolated from cystic fibrosis patients. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2001;51:271-9.
55. Drevinek P, Vosahlikova S, Cinek O et al. Widespread clone of *Burkholderia cenocepacia* in cystic fibrosis patients in the Czech Republic. *J Med Microbiol*. 2005 Jul;54(Pt 7):655-9.
56. Drevinek P, Hrbackova H, Cinek O et al. Direct PCR Detection of *Burkholderia cepacia* Complex and Identification of Its Genomovars by Using Sputum as Source of DNA. *J Clin Microbiol*. 2002;40(9):3485-8.
57. Loutet SA, Valvano MA. A decade of *Burkholderia cenocepacia* virulence determinant research. *Infect Immun*. 2010 Jul 19.
58. Hunt TA, Kooi C, Sokol PA et al. Identification of *Burkholderia cenocepacia* genes required for bacterial survival in vivo. *Infect Immun*. 2004 Jul;72(7):4010-22.
59. Lewenza S, Conway B, Greenberg EP et al.. Quorum sensing in *Burkholderia cepacia*: identification of the LuxRI homologs CepRI. *J Bacteriol*. 1999 Feb;181(3):748-56.
60. Malott RJ, Baldwin A, Mahenthiralingam E et al.. Characterization of the *cciIR* quorum-sensing system in *Burkholderia cenocepacia*. *Infect Immun*. 2005 Aug;73(8):4982-92.
61. O'Grady EP, Viteri DF, Malott RJ et al. Reciprocal regulation by the *CepIR* and *CciIR* quorum sensing systems in *Burkholderia cenocepacia*. *BMC Genomics*. 2009;10:441.
62. Suppiger A, Schmid N, Aguilar C et al. Two quorum sensing systems control biofilm formation and virulence in members of the *Burkholderia cepacia* complex. *Virulence* 2013 Jul;4(5):400-9.
63. Malott RJ, Sokol PA Expression of the *bviIR* and *cepIR* quorum-sensing systems of *Burkholderia vietnamiensis*. *J Bacteriol* 2007;189:3006–16.
64. Savoia D, Zucca M. Clinical and environmental *Burkholderia* strains: biofilm production and intracellular survival. *Curr Microbiol*. 2007 Jun;54(6):440-4.
65. Sokol PA, Malott RJ, Riedel K et al. Communication systems in the genus *Burkholderia*: global regulators and targets for novel antipathogenic drugs. *Future Microbiol*. 2007 Oct;2(5):555-63.
66. Drevinek P, Mahenthiralingam E. *Burkholderia cenocepacia* in cystic fibrosis: epidemiology and molecular mechanisms of virulence. *Clin Microbiol Infect*. 2010;16(7):821-30.
67. Urban TA, Goldberg JB, Forstner JF et al. Cable pili and the 22-kilodalton adhesin are required for *Burkholderia cenocepacia* binding to and transmigration across the squamous epithelium. *Infect Immun*. 2005 Sep;73(9):5426-37.
68. Wenjun Li, Raoult D, Fournier PE Bacterial strain typing in the genomic era. *FEMS Microbiol Rev* 2009;33:892–916.
69. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 1997;18(6):426-39.
70. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*. 1995;33(9):2233-9.

71. Vosahlikova S, Drevinek P, Cinek O et al. High genotypic diversity of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients with cystic fibrosis in the Czech Republic. *Res Microbiol*. 2007 May;158(4):324-9.
72. Barbosa AR, Giufrè M, Cerquetti M et al. Polymorphism in *ftsI* gene and {beta}-lactam susceptibility in Portuguese *Haemophilus influenzae* strains: clonal dissemination of beta-lactamase-positive isolates with decreased susceptibility to amoxicillin/clavulanic acid. *J Antimicrob Chemother* 2011 Apr;66(4):788-96.
73. Leung V, Loo VG, Frenette C et al. First Canadian outbreak of Enterobacteriaceae-expressing *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase type 3. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. 2012 Fall;23(3):117-20.
74. Bouchet V, Huot H, Goldstein R. Molecular Genetic Basis of Ribotyping. *Clin Microbiol Rev*. 2008;21(2):262.
75. Bischoff KM, White DG, McDermott PF et al. Characterization of chloramphenicol resistance in beta-hemolytic *Escherichia coli* associated with diarrhea in neonatal swine. *J Clin Microbiol* 2002; Feb;40(2):389-94.
76. Ling JM, Lo NW, Ho YM et al. Molecular methods for the epidemiological typing of *Salmonella enterica* serotype Typhi from Hong Kong and Vietnam. *J Clin Microbiol* 2000;Jan;38(1):292-300.
77. Kostman JR, Edlind TD, LiPuma JJ et al. Molecular epidemiology of *Pseudomonas cepacia* determined by polymerase chain reaction ribotyping. *J Clin Microbiol* 1992;30:2084–2087.
78. Verduin CM, Kools-Sijmons M, van der Plas J et al. Complement-resistant *Moraxella catarrhalis* forms a genetically distinct lineage within the species. *FEMS Microbiol Lett*. 2000 Mar 1;184(1):1-8.
79. Mahenthiralingam E, Marchbank A, Drevinek P et al. Use of colony-based bacterial strain typing for tracking the fate of *Lactobacillus* strains during human consumption. *BMC Microbiol*. 2009;9:251.
80. Stern MJ, Ames GF, Smith NH et al. Repetitive extragenic palindromic sequences: A major component of the bacterial genome. *Cell*. 1984;37:1015-26.
81. Gilson E, Clément JM, Brutlag D et al. A family of dispersed repetitive extragenic palindromic DNA sequences in *E. coli*. *EMBO J* 1984 June; 3(6):1417–21.
82. Mohapatra BR, Broersma K, Mazumder A Comparison of five rep-PCR genomic fingerprinting methods for differentiation of fecal *Escherichia coli* from humans, poultry and wild birds. *FEMS Microbiol Lett*. 2007;277(1):98-106.
83. Nunvar J., Drevinek P, Licha I. DNA profiling of *Stenotrophomonas maltophilia* by PCR targeted to its species-specific repetitive palindromic sequences. *Lett Appl Microbiol*. 2012 Jan;54(1):59-66.
84. Martin B, Humbert O, Camara M et al. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. *Nucleic Acids Res* 1992 July 11;20(13):3479–83.
85. Jackson CR, Furtula V, Farrell EG et al.. A comparison of BOX-PCR and pulsed-field gel electrophoresis to determine genetic relatedness of enterococci from different environments. *Microb Ecol* 2012 Aug;64(2):378-87.
86. Hulton CS, Higgins CF, Sharp PM ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Mol Microbiol* 1991;Apr;5(4):825-34.
87. Saito S, Kobayashi M, Kimoto-Nira H et al. Intraspecies discrimination of *Lactobacillus paraplantarum* by PCR. *FEMS Microbiol Lett* 2011 Mar;316(1):70-6.

88. Stephenson DP, Moore RJ, Allison GE Comparison and utilization of repetitive-element PCR techniques for typing *Lactobacillus* isolates from the chicken gastrointestinal tract. *Appl Environ Microbiol* 2009 Nov;75(21):6764-76.
89. Huys G, Cnockaert M, Vaneechoutte, Met al. Distribution of tetracycline resistance genes in genotypically related and unrelated multiresistant *Acinetobacter baumannii* strains from different European hospitals. *Res Microbiol*. 2005;156:348-355.
90. Rasschaert G, Houf K, Imberechts H et al. Comparison of five repetitive sequence based PCR typing methods for molecular typing of *Salmonella enterica* isolates. *J Clin Microbiol*. 2005;43:3615-23.
91. Svec P, Nováková D, Zácková L et al. Evaluation of (GTG)₅-PCR for rapid identification of *Streptococcus mutans*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2008 Nov;94(4):573-9.
92. Carter MW, Harrison TG, Shuja Shafi M, RC. G. Typing strains of *Chlamydia pneumoniae* by amplified fragment length polymorphism typing. *Clin Microbiol Infect*. 1998 Jan;4(11):663-4.
93. Nemec A, Krízová L, Maixnerová M et al. Emergence of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* in the Czech Republic is associated with the spread of multidrug-resistant strains of European clone II. *J Antimicrob Chemother*. 2008 Sep;62(3):484-9.
94. Sacchi CT, Whitney AM, Reeves MW et al. Sequence diversity of *Neisseria meningitidis* 16S rRNA genes and use of 16S rRNA gene sequencing as a molecular subtyping tool. *J Clin Microbiol* 2002 Dec;40(12):4520-7.
95. Königsson MH, Bölske G, Johansson KE. J. Intraspecific variation in the 16S rRNA gene sequences of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis* strains. *Vet Microbiol*. 2002 Mar 22;85(3):209-20.
96. Karjalainen T, Saumier T, Barc MC et al. *Clostridium difficile* Genotyping Based on *slpA* Variable Region in S-Layer Gene Sequence: an Alternative to Serotyping. *J Clin Microbiol* 2002 July;40(7):2452–8.
97. Yamamoto S, Harayama S. Phylogenetic analysis of *Acinetobacter* strains based on the nucleotide sequences of *gyrB* genes and on the amino acid sequences of their products. *Int J Syst Bacteriol* 1996 Apr;46(2):506-11.
98. Lee CS, Wetzel K, Buckley T et al. Rapid and sensitive detection of *Pseudomonas aeruginosa* in chlorinated water and aerosols targeting *gyrB* gene using real-time PCR. *J Appl Microbiol* 2011 Oct;111(4):893-903.
99. Stefani S, Chung DR, Jodi A et al. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): global epidemiology and harmonisation of typing methods. *Int J Antimicrob Agents*. 2012;Apr;39(4): 273– 82.
100. Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE et al. Restricted structural gene polymorphism in the mycobacterium tuberculosis complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Sep 2;94(18):9869-74.
101. Gupta S, Maiden M.J. Maiden Exploring the evolution of diversity in pathogen populations. *Trends Microbiol* 2001 Apr;9(4):181-5.
102. Achtman M, Zurth k, Morelli G et al. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. *PNAS*. 1999;vol 96(24):14043-8.
103. Read TD, Salzberg SL, Pop M et al. Comparative genome sequencing for discovery of novel polymorphisms in *Bacillus anthracis*. *Science*. 2002 Jun 14;296(5575):2028-33.
104. van Loo IH, Heuvelman KJ, King AJ et al. Multilocus sequence typing of *Bordetella pertussis* based on surface protein genes. *J Clin Microbiol*. 2002 Jun;40(6):1994-2001.

105. Jolley KA, Bliss CM, Bennett JS et al. Ribosomal multilocus sequence typing: universal characterization of bacteria from domain to strain. *Microbiology* 2012;Apr;158(Pt 4): 1005-15.
106. Houplikian P, Raoult D. 16S/23S rRNA intergenic spacer regions for phylogenetic analysis, identification, and subtyping of *Bartonella* species. *J Clin Microbiol* 2001;Aug;39(8):2768-78.
107. Borneman J, Triplett EW. Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. *Appl Environ Microbiol* 1997 Jul;63(7):2647-53.
108. Wiehlmann L, Wagner G, Cramer N et al. Population structure of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 May 8; (104(19):):8101-6.
109. Johansen IS, Lundgren B, Sosnovskaja A et al. Direct detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens in low- and high-incidence countries by line probe assay. *J Clin Microbiol* 2003 Sep;41(9):4454-6.
110. LiPuma JJ, Mortensen JE, Dasen SE et al. Ribotype analysis of *Pseudomonas cepacia* from cystic fibrosis treatment centers. *J Pediatr*. 1988 Nov;113(5):859-62.
111. Siddiqui AH, Mulligan ME, Mahenthalingam E et al. An episodic outbreak of genetically related *Burkholderia cepacia* among non-cystic fibrosis patients at a university hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2001;22(7):419-22.
112. Agodi A, Barchitta M, Giannino V et al. *Burkholderia cepacia* complex in cystic fibrosis and non-cystic fibrosis patients: identification of a cluster of epidemic lineages. *J Hosp Infect*. 2002;50(3):188-95.
113. Holmes A, Nolan R, Taylor R, Finley R, Riley M, Jiang RZ, et al. An epidemic of *Burkholderia cepacia* transmitted between patients with and without cystic fibrosis. *J Infect Dis*. 1999;179(5):1197-205.
114. Mahenthalingam E, Campbell ME, Henry DA et al. Epidemiology of *Burkholderia cepacia* infection in patients with cystic fibrosis: analysis by randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting. *J Clin Microbiol*. 1996;34(12):2914-20.
115. Coenye T, Schouls LM, John RW et al. Identification of *Burkholderia* species and genomovars from cystic fibrosis patients by AFLP fingerprinting. *Int J Syst Bacteriol* 1999; Oct;49 Pt 4:1657-66.
116. Spilker T, Baldwin A, Bumford A et al. Expanded multilocus sequence typing for *Burkholderia* species. *J Clin Microbiol*. 2009 Aug;47(8):2607-10.
117. Akopyants NS, Fradkov A, Diatchenko L et al. PCR-based subtractive hybridization and differences in gene content among strains of *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Oct 27;95(22):13108-13.
118. Reckseidler SL, DeShazer D, Sokol PA et al. Detection of bacterial virulence genes by subtractive hybridization: identification of capsular polysaccharide of *Burkholderia pseudomallei* as a major virulence determinant. *Infect Immun* 2001;69(1):34-44.
119. Bernier SP, Sokol PA. Use of suppression-subtractive hybridization to identify genes in the *Burkholderia cepacia* complex that are unique to *Burkholderia cenocepacia*. *J Bacteriol* 2005;187(15):5278-91.
120. Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP et al. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996 Jun 11;93(12):6025-30.
121. Holden MT, Seth-Smith HM, Crossman LC et al. The genome of *Burkholderia cenocepacia* J2315, an epidemic pathogen of cystic fibrosis patients. *J Bacteriol*. 2009 Jan;191(1):261-77.

122. Winsor GL, Khaira B, Van Rossum T et al. The Burkholderia Genome Database: facilitating flexible queries and comparative analyses. *Bioinformatics*. 2008 Dec 1;24(23):2803-4.
123. Maddocks SE, Oyston PC Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. *Microbiology* 2008 Dec;154(Pt 12):3609-23.
124. Ramos JM, Martínez-Bueno M, Molina-Henares AJ et al. The TetR Family of Transcriptional Repressors. *Microbiol Mol Biol Rev* 2005 June; 69(2): 326–356..
125. Drevinek P, Baldwin A, Dowson CG et al. Diversity of the parB and repA genes of the Burkholderia cepacia complex and their utility for rapid identification of Burkholderia cenocepacia. *BMC Microbiol*. 2008;8:44.
126. Liu L, Spilker T, Coenye T et al. Identification by subtractive hybridization of a novel insertion element specific for two widespread Burkholderia cepacia genomovar III strains. *J Clin Microbiol*. 2003;41(6):2471-6.
127. Hanulik V, Webber MA, Chroma M et al. An outbreak of Burkholderia multivorans beyond cystic fibrosis patients. *J Hosp Infect* 2013 Jul;84(3):248-51.
128. Rosenfeld M, Davis R, FitzSimmons S et al. Gender gap in cystic fibrosis mortality. *Am J Epidemiol* 1997;May 1;145(9):794-803.
129. Salvatore F, Scudiero O, Castaldo G. Genotype-phenotype correlation in cystic fibrosis: the role of modifier genes. *Am J Med Genet* 2002 Jul 22;111(1):88-95.
130. Kulich M, Rosenfeld M, Goss CH et al. Improved survival among young patients with cystic fibrosis. *J Pediatr* 2003;Jun;142(6):631-6.
131. Meijer AH, Spaink HP. Host-Pathogen Interactions Made Transparent with the Zebrafish Model. *Current Drug Targets*, . 2011;12:1000-17.
132. Levraud JP, Colucci-Guyon E, Redd MJ et al. In Vivo Analysis of Zebrafish Innate Immunity. *Methods in Molecular Biology*, vol 415: Innate Immunity. 2008.
133. Vergunst AC, Meijer AH, Renshaw SA et al. Burkholderia cenocepacia creates an intramacrophage replication niche in zebrafish embryos, followed by bacterial dissemination and establishment of systemic infection. *Infect Immun*. 2010 Jan 19;78(4):1495-508.
134. Cox MJ, Allgaier M, Taylor B et al. Airway microbiota and pathogen abundance in age-stratified cystic fibrosis patients. *PLoS One* 2010 Jun 23;5(6):e11044.
135. Fodor AA, Klem ER, Gilpin DF et al. The adult cystic fibrosis airway microbiota is stable over time and infection type, and highly resilient to antibiotic treatment of exacerbations. *PLoS One*. 2012;7(9):e45001.

10. SEZNAM TABULEK, OBRÁZKŮ, GRAFŮ A SCHÉMAT

- Tabulka č. 1** Současná taxonomická podoba Bcc s místem výskytu izolátů jednotlivých druhů.
- Tabulka č. 2** Druhovú distribuce Bcc v populaci pacientů s CF ve vybraných státech.
- Tabulka č. 3** Přehled nejvýznamnějších epidemických kmenů v populacích pacientů s CF.
- Tabulka č. 4** Druhovú a kmenovú distribuce transientních infekcí s délkou trvání infekce.
- Tabulka č. 5** Analýza všech inzertů získaných pomocí GSH.
- Tabulka č. 6** Druhovú distribuce infekcí Bcc v CCF ve FN v Motole za 10 leté období (2001-2010).
- Tabulka č. 7** Seznam izolátů, které byly vybrány pro Analýzu přežití mikroorganismu v hostiteli.
- Tabulka č. 8** Shrnutí rozdílů průběhu infekce pozorovaných u izolátů 7272 a 7419 v čase 22 a 46 hpi.

- Obrázek č. 1A, B** Shrnutí longitudinálních vyšetření pacientů s infekcí Bcc, jejichž infekce byla
prvně diagnostikována pouze PCR.
- Obrázek č. 2** Ukázka separace RAPD fragmentů pomocí elektroforézy Bioanalyzeru 2100 Agilent.
- Obrázek č. 3** Porovnání dvou samostatných PFGE kmenů *B. cenocepacia* ST32 (klinické izoláty) a ST28 (referenční kmen Bcc0665).
- Obrázek č. 4** Clusterová analýza RAPD profilů kmenů *B. cenocepacia* ST32 (10 klinických izolátů od 10 pacientů s ST32 infekcí) a ST28 (referenční kmeny Bcc0665 a Bcc0313) provedených v různých časových intervalech.
- Obrázek č. 5** Provedení genomické subtraktivní hybridizace.
- Obrázek č. 6** Sekvence adaptorů 1 a 2R s odpovídající primery.
- Obrázek č. 7** Očekávaný výsledek kontroly ligace pro *B. cenocepacia* ST32.
- Obrázek č. 8** RAPD fingerprintové profily kmenů *B. cenocepacia* ST28, ST32 a ST33. **A)** použit RAPD primer 270, **B)** použit primer RAPD 272.
- Obrázek č. 9** PFGE kmenů *B. cenocepacia* ST28, ST32 a ST33.
- Obrázek č. 10** Charakteristika DNA oblasti v genomu ST32 obsahující cílovou sekvenci pro navržení primerů pro ST32-PCR.
- Obrázek č. 11 A)** Danio pruhované, nahoře samička, dole sameček; **B)** transgenní Danio pruhované.
- Obrázek č. 12** Embryo Danio pruhovaného v chorionu
- Obrázek č. 13** Embryogeneze Dania pruhované do stádia 72 hpf.
- Obrázek č. 14** Odstranění chorionu embrya 28 hpf.
- Obrázek č. 15** Instrumentace potřebná k mikroinjekci bakterií do embrya Dania pruhovaného.
- Obrázek č. 16** Znázornění místa infikování embrya v oblasti krevního ostrova.

Obrázek č. 17 Analýza infekce v reálném čase způsobené izoláty 7272 a 7419 od pacienta I v čase 46 hpi.

Obrázek č. 18 Shluková analýza RISA profilů vzorků sput od pacientů ze skupina (i) a (iv).

Obrázek č. 19 RISA analýza longitudinálních vzorků sput od 2 pacientů (pacient A a B) chronicky infikovaných *B. cenocepacia* ST32.

Obrázek č. 20 Shluková analýza vyšetřených vzorků sput ze skupin (ii), (iii) a (v) vyšetřených RISA analýzou.

Obrázek č. 21 RISA analýza vzorků sput od pacientů z CCF v Manchesteru.

Graf č. 1 Vývoj infekce Bcc od roku 1994 až 2010.

Graf č. 2 Kaplan-Meierovy křivky přežití 31 *B. cenocepacia* ST32 izolátů a jejich distribuce do virulentních skupin na základě virulentního potenciálu.

Graf č. 3 Kaplan-Meierovy křivky 3 izolátů použitých pro Kinetickou analýzu a Analýzu v reálném čase.

Graf č. 4 Bakteriální replikace izolátů 7272 (modře), 7419 (hnědě) a 8210 (červeně) v embryích *Dania* pruhovaného během 48 hpi.

Schéma č. 1 Schématické znázornění výsledků diagnostiky infekce Bcc za období 1994 až duben 2001 a květen 2001 až prosinec 2010

Schéma č. 2 Rozvržení a kombinace primerů pro jednotlivé kroky nested MLST pro vyšetření z klinického materiálu a MLST vyšetření z bakteriální kultury.

Schéma č. 3 Systém surveillance infekcí Bcc v LMG Pediatrické kliniky a ÚLM.

III. PŘÍLOHY

11. PUBLIKACE

11.1. Publikace č. 1

Direct culture-independent strain typing of *Burkholderia cepacia* complex in sputum samples from patients with cystic fibrosis.

Drevinek P, Vosahlikova S, Dedeckova K, Cinek O, Mahenthiralingam E.

J Clin Microbiol. 2010 May;48(5):1888-91.

Cíl publikované práce:

Stávající systém genotypizační metody multilokusové sekvenční typizace převést do nested schématu, tak aby byla možná detekce kmene přímo z klinického materiálu pacientů s cystickou fibrózou.

11.2. Publikace č. 2

PCR detection of *Burkholderia cepacia* complex as one of key factors to handle a long-term outbreak.

Dedeckova K, Fila L, Skalicka V, Bartosova J, Kucerova T, Vavrova V, Zemkova D, Kalferstova L, Melter O, Cinek O, Drevinek P.

J Cyst Fibros. 2012 Sep;11(5):440-5.

Cíl publikované práce:

Zmapovat epidemiologickou situace bakterií z komplexu *Burkholderia cepacia* v Centru cystické fibrózy ve Fakultní nemocnici v Motole od roku 1994 až 2010 a popsat změny v druhovém a kmenovém rozložení infekcí způsobené bakteriemi komplexu *Burkholderia cepacia*. Zhodnocení výhod a užitečnosti použití *recA* PCR metody v rutinní diagnostice.

11.3. Publikace č. 3

Novel diagnostic PCR assay for *Burkholderia cenocepacia* epidemic strain ST32 and its utility in monitoring infection in cystic fibrosis patients.

Dedeckova K, Kalferstova L, Strnad H, Vavrova J a Drevinek P.

J Cyst Fibros. 2013 Sep; 12(5):475-81.

Cíl publikované práce:

Navržení jednoduché, rychlé a levné molekulárně genetické metody, která by diagnostikovala infekci způsobenou epidemickým kmenem *B. cenocepacia* ST32 bez nutnosti použití časově náročných a dražších metod genotypizace.

Blíže charakterizovat na molekulární úrovni náš epidemický kmen porovnáním jeho genomu s genomem osekvenovaného kmene *B. cenocepacia* ST28 za pomoci genomické subtraktivní hybridizace.